



**Rita Martins de Moraes Rosa**

Licenciatura em Ciências de Engenharia Biomédica

**Incorporação de nanopartículas de prata  
em matrizes de nanofibras de  
polivinilpirrolidona e avaliação do seu  
potencial antibacteriano**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em  
Engenharia Biomédica

Orientador: Célia Reis Henriques, Professor Auxiliar, FCT-UNL  
Co-orientador: Jorge Carvalho e Silva, Professor Auxiliar, FCT-UNL  
Co-orientador: Ilda Sanches Santos, Professor Associado, FCT-UNL

Júri:

Presidente: Prof. Doutor Mário António Basto Forjaz Secca, Professor Associado, FCT- UNL  
Arguente: Prof. Doutora Maria Gabriela Gomes de Figueiredo Rodrigues, FC-UL  
Vogais: Prof. Doutora Célia Maria Reis Henriques, FCT-UNL  
Prof. Ilda Maria Barros dos Santos Gomes Sanches, FCT-UNL



INCORPORAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA EM MATRIZES DE NANOFIBRAS  
DE POLIVINILPIRROLIDONA E AVALIAÇÃO DO SEU POTENCIAL ANTIMICROBIANO

Copyright©2012 - Todos os direitos reservados. Rita Martins de Moraes Rosa. Faculdade de Ciências e Tecnologia. Universidade Nova de Lisboa.

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objectivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.





*"Pedras no caminho? Guardo todas, um dia vou construir um Castelo"*  
Fernando Pessoa



# Agradecimentos

Embora uma Dissertação de Mestrado seja, pela sua finalidade académica, um trabalho individual, há contributos de natureza diversa que não podem e nem devem deixar de ser realçados. Por essa razão, desejo expressar os meus sinceros agradecimentos:

Aos meus orientadores, Professora Célia Henriques e Professor Jorge Silva, do grupo GREAT (Grupo de Engenharia dos Tecidos) do Departamento de Física, por me terem proporcionado a realização deste trabalho. Acima de tudo por toda a ajuda, dedicação, incentivo, empenho e acompanhamento científico e pessoal ao longo deste trabalho. Um agradecimento especial à Professora Célia Henriques, pelo tempo dispensado nas sugestões e correcções da versão final desta Dissertação de Mestrado.

À minha co-orientadora, Professora Ilda Santos Sanches, do Departamento de Ciências da Vida, por todo o acompanhamento científico e pessoal. Por todo o tempo de paciência e dedicação, principalmente na área de Microbiologia, onde me ensinou e ajudou a desenvolver todo um conjunto de técnicas laboratoriais essenciais à realização dos testes apresentados neste trabalho.

À Professora Ana Silva da Faculdade de Engenharia da Universidade Católica Portuguesa, por ter cedido o laboratório para as culturas celulares e por toda a dedicação e auxílio prestado para que os testes de citotoxicidade e adesão celular tivessem sido feitos num curto espaço de tempo, até mesmo durante o fim-de-semana.

À Professora Susana Sérgio e ao Professor Yuri Nunes do Departamento de Física, por terem permitido a utilização continua do aparelho de espectrofotometria.

À Tânia Costa do Departamento de Ciências da Vida, por todo o apoio e ajuda prestada na realização dos testes de Microbiologia.

Aos meus colegas e amigos de trabalho no GREAT, Ana Marques, João Martins, Joana Fonseca, Mafalda Fernandes, Susana Gomes e Valdir Tavares, por toda a amizade, alegria e ajuda. Assim todos os dias de trabalho tornaram-se mais curtos e menos cansativos.

Aos meus Pais e irmã, obrigada por toda a paciência e apoio ao longo destes 24 anos e porque a eles devo tudo o que sou hoje.

A todos os meus amigos/amigas, em particular à Joana Branquinho, Tita Alves, Cristina

Teixeira e ao Grupo Alerta.

Às 15, minhas amigas que desde sempre me têm acompanhado e estão sempre presentes em todos os momentos importantes da minha vida.

Ao meu grande grupo de amigos, Ana Frazão, Ana Marques, Mafalda Fernandes, Rita Carvalho, Sara Gil, Susana Gaspar, Susana Martinho, Bernardo Azevedo, Fernando Mota, Filipe Catarino, Hugo Pereira, João Martins, João Santinha, Joaquim Horta, Leonardo Martins, Luis Mendes, Nuno Fernandes, Pedro Martins, Pedro Cascalho, Sérgio Mendes, que estiveram sempre ao meu lado nesta longa jornada de 5 anos de Faculdade. Obrigada por toda a amizade e momentos passados, sem vocês os dias não teriam tido a mesma alegria.

E para finalizar, ao Gonçalo Cardoso. Obrigada por todo o amor, paciência, apoio, incentivo e amizade, pela determinação que me transmite. Contigo aprendi a ACREDITAR.

# Resumo

A incorporação de nanopartículas de prata (NPs) em substitutos de pele tem vindo a aumentar devido às suas características biocidas, sendo a utilização de matrizes de nanofibras ideal para este tipo de aplicações.

Neste trabalho foram produzidas matrizes de nanofibras por electrofiação de soluções poliméricas de polivinilpirrolidona (PVP, um polímero solúvel em água) com diferentes proporções de nitrato de prata ( $\text{AgNO}_3$ ) e, posteriormente, foram analisadas. As matrizes foram sujeitas a radiação UV, proporcionando a reticulação do PVP e a formação de NPs. Estes processos, bem como a libertação de NPs para água, foram analisados por espectrofotometria de UV-vis. Uma vez imersas em água, foi também calculado o grau de inchamento e a perda de massa das matrizes. Os efeitos antimicrobianos em vários microrganismos (bactérias e fungos) e de citotoxicidade em células epiteliais humanas de rim (HEK) foram analisados por difusão por disco (teste de Kirby-Bauer) /Concentração Mínima Inibitória (MIC) e por testes de citotoxicidade e adesão celular, respectivamente.

Com o aumento do tempo de irradiação UV verificou-se uma diminuição da perda de massa nas matrizes e um aumento da absorvância a 290 nm. Com o aumento da proporção de PVP: $\text{AgNO}_3$  utilizada e dos diferentes tempos de irradiação UV, tanto o tamanho médio (abaixo dos 10nm) como a dispersão do tamanho das NPs aumentaram na amostra. A presença de NPs originou um pico de absorvância (~425 nm) ao fim de 4 horas de irradiação, estabilizando em seguida. Este pico deslocou-se para comprimentos de onda superiores com o aumento do diâmetro das NPs na amostra. A taxa de libertação de NPs para água foi aumentando nas primeiras 2 horas, estabilizando em seguida.

As matrizes com NPs incorporadas demonstraram possuir uma actividade bacterioestática contra os microrganismos e ser tóxicos quando em contacto com as células humanas HEK.

**Palavras chave:** electrofiação, reticulação de nanofibras de PVP e formação de nanopartículas de prata por UV, testes de espectrofotometria de UV-Vis, TEM, testes de difusão de Kirby-Bauer, testes de citotoxicidade.



# Abstract

Silver nanoparticles (NPs) have emerged as good candidates to confer skin substitutes with protection capabilities against infections. Electrospun mats (EMs) are particularly adequate for such an application. In this work, polyvinylpyrrolidone (PVP, a water soluble polymer) EMs were produced from solutions containing silver nitrate ( $\text{AgNO}_3$ ). EMs morphology was characterized by SEM. UV irradiation photocrosslinked the polymer and induced the formation of NPs. Both processes, as well as the release of NPs from EMs to water, were analyzed by UV-Vis spectrophotometry. Weight loss of EMs when immersed in water was measured. NPs were characterized by TEM. Their activity against several microorganisms and toxicity to Human Epithelial Kidney (HEK) cells were assessed, respectively, by disk diffusion/minimal inhibitory concentration and in vitro cell cytotoxicity tests.

Increasing UV irradiation time led to EMs weight loss decreases, accompanied by an increase of absorbance at 290 nm. When either the ratio of PVP: $\text{AgNO}_3$  used or the UV irradiation time were increased, the mean sizes (all below 10 nm) as well as the dispersion of particles size in the sample also increased. The NPs originated an absorbance peak (around 425 nm) which increased in the first 4 h of irradiation, then stabilized, and shifted as the NPs mean size in a sample increased. The concentration of NPs released to water from an immersed EM increased in the first 2 h followed by stabilization. All EMs showed a bacteriostatic activity and to be cytotoxic to HEK when in presence of NPs.

**Keywords:** electrospinning, UV irradiation photocrosslinked of PVP nanofiber and formation of silver nanoparticles, UV-Vis spectrophotometry, TEM, Kirby-Bauer disk diffusion, cell cytotoxicity tests.





# Lista de acrónimos

Abs - Absorvância

ADN - Ácido desoxirribonucleico

ATP - Adenosina Tri-Fosfato

CFU - número de colónias formadas (do inglês, *colony formated units*)

c.d.o - comprimento de onda

MIC - Concentração Mínima Inibitória

ET - Engenharia dos Tecidos

ES- Electrofiação (do inglês, *electrospinning*)

MEC -Matriz Extra Celular

NP- Nanopartícula de Prata

PVP- PoliVinilPirrolidona

SPR - Ressonância Plasmónica Superficial (do inglês,*Surface Plamon Resonance*)

SEM - Microscopia Electrónica de Varrimento (do inglês, *Scanning Electron microscope*)

TEM - Microscopia Electrónica de Transmissão (do inglês, *transmition electron microscope*)

UV-Vis - Espectrofotometria de UV-Visível



# Lista de símbolos

$M_w$	Massa Molecular
$\text{AgNO}_3$	Nitrato de Prata



# Conteúdo

<b>Agradecimentos</b>	<b>vii</b>
<b>Resumo</b>	<b>ix</b>
<b>Abstract</b>	<b>xi</b>
<b>Lista de acrónimos</b>	<b>xiii</b>
<b>Lista de símbolos</b>	<b>xv</b>
<b>Conteúdo</b>	<b>xvii</b>
<b>Lista de figuras</b>	<b>xxi</b>
<b>Lista de tabelas</b>	<b>xxv</b>
<b>1 Enquadramento Teórico</b>	<b>1</b>
1.1 Introdução . . . . .	1
1.2 Engenharia dos Tecidos . . . . .	3
1.3 Biomateriais . . . . .	6
1.4 Matrizes de nanofibras obtidas por electrofiação . . . . .	6
1.4.1 Processo de Electrofiação . . . . .	7
1.4.2 Parâmetros que influenciam o processo de electrofiação . . . . .	7
1.4.3 Matrizes de nanofibras com propriedades antisépticas . . . . .	11
1.5 Microbiologia . . . . .	11
1.5.1 Bactérias . . . . .	11
1.5.2 Acção dos Antibióticos . . . . .	12
1.5.3 Fungos . . . . .	13
1.6 Nanopartículas de Prata como agente biocida . . . . .	14
1.6.1 Mecanismos de acção sobre microrganismos . . . . .	14
1.6.2 Citototoxicidade . . . . .	16
1.7 Polímeros . . . . .	19

1.7.1	PoliVinilPirrolidona . . . . .	19
1.7.2	PVP como estabilizador das nanopartículas de prata . . . . .	19
<b>2</b>	<b>Procedimento Experimental</b>	<b>21</b>
2.1	Soluções Poliméricas . . . . .	21
2.1.1	Obtenção das soluções . . . . .	21
2.1.2	Condutividade . . . . .	22
2.2	Produção de Filmes . . . . .	22
2.3	Produção das matrizes de nanofibras . . . . .	22
2.3.1	Electrofição . . . . .	22
2.3.2	Avaliação microscópica das fibras . . . . .	24
2.4	Insolubilização do PVP em meios aquosos . . . . .	25
2.4.1	Processo de reticulação . . . . .	25
2.4.2	Grau de inchamento e perda de massa . . . . .	25
2.5	Formação das nanopartículas de prata . . . . .	26
2.5.1	Análise microscópica das nanopartículas . . . . .	26
2.6	Espectrofotometria UV-visível . . . . .	28
2.6.1	Detecção da formação das nanopartículas de prata . . . . .	29
2.6.2	Libertação de NPs para água . . . . .	29
2.7	Testes Microbiológicos . . . . .	30
2.7.1	Preparação dos meios . . . . .	31
2.7.2	Preparação das culturas de microrganismos . . . . .	31
2.7.3	Determinação da concentração celular em meio líquido . . . . .	32
2.7.4	Concentração mínima inibitória (MIC) . . . . .	33
2.7.5	Testes de Kirby-Bauer . . . . .	35
2.7.6	Avaliação do efeito biocida provocado pelas nanopartículas de Prata . . . . .	37
2.8	Testes de citotoxicidade . . . . .	37
<b>3</b>	<b>Resultados e Discussão</b>	<b>41</b>
3.1	Soluções Poliméricas e nanofibras obtidas por electrofição . . . . .	41
3.2	Estabilidade das amostras de PVP irradiadas em água . . . . .	46
3.2.1	Grau de inchamento e perda de massa . . . . .	46
3.3	Espectrofotometria de UV-Visível . . . . .	48
3.3.1	Formação das nanopartículas de prata . . . . .	48
3.3.2	Libertação de nanopartículas de prata para água . . . . .	51
3.4	Estudo da morfologia das nanopartículas de prata . . . . .	56
3.4.1	Efeito da variação da proporção de PVP para AgNO <sub>3</sub> . . . . .	56
3.4.2	Efeito da variação do tempo de irradiação UV . . . . .	59
3.5	Testes Microbiológicos . . . . .	63

3.5.1	Determinação da Concentração Mínima Inibitória . . . . .	63
3.5.2	Testes de difusão pelo método de Kirby- Bauer . . . . .	68
3.6	Testes de citotoxicidade . . . . .	73
<b>4</b>	<b>Conclusões e Perspectivas Futuras</b>	<b>77</b>
	<b>Bibliografia</b>	<b>81</b>
<b>A</b>	<b>Anexo</b>	<b>87</b>
A.1	Procedimento dos testes de citotoxicidade por contacto directo e de Adesão Celular . . . . .	87
A.1.1	Manutenção das culturas . . . . .	87
A.1.2	Contagem Celular . . . . .	88
A.1.3	Avaliação da viabilidade celular com recurso ao teste PrestoBlue™ . .	89
A.1.4	Fixação das matrizes para o teste de Adesão Celular nas matrizes de nanofibras . . . . .	89





# Lista de figuras

1.1	Representação de alguns dos ingredientes considerados em ET. . . . .	4
1.2	Abordagem da ET pela utilização de matrizes celularizadas para fins terapêuticos	5
1.3	Esquematização do processo de electrofiação. . . . .	7
1.4	Ilustração esquemática do percurso do jacto de solução polimérica no processo de electrofiação. . . . .	8
1.5	Estrutura da parede celular das bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. .	12
1.6	Imagens obtidas por TEM onde se visualiza os efeitos das nanopartículas de prata sobre a bactéria <i>P. aeruginosa</i> . . . . .	15
1.7	Imagens obtidas por TEM onde se visualizam os efeitos das nanopartículas de prata sobre o fungo <i>C. albicans</i> . . . . .	16
1.8	Representação dos mecanismos de acção das nanopartículas de prata sobre células eucariontes provocando a perda de viabilidade celular. . . . .	18
1.9	Imagens obtidas por TEM nas quais se observa a biodistribuição das NPs em células cancerígenas. . . . .	18
1.10	Polimerização do monómero VinilPirrolidona . . . . .	19
1.11	Complexo formado entre o PVP e a prata. . . . .	20
2.1	Montagem utilizada para o processo de electrofiação. . . . .	23
2.2	Microscópio de Transmissão Electrónica. . . . .	27
2.3	Grelhas de cobre para suporte das amostras para TEM. . . . .	27
2.4	Imagens de microscópio óptico das grelhas com as nanofibras depositadas para observação em TEM. . . . .	28
2.5	Aparelho usado nos estudos de espectrofotometria e célula utilizada. . . . .	30
2.6	Esquematização das diluições efectuadas. . . . .	33
2.7	Curvas de crescimento para a estirpe <i>S.aureus</i> . . . . .	34
2.8	Modo de aplicação do inóculo com auxílio de uma zaragatoa sobre a placa de Agar. . . . .	36
2.9	Representação da área de inibição para um disco de matriz de nanofibras. . .	36
2.10	Preparação da placa de poços com as respectivas amostras para a realização dos testes de citotoxicidade . . . . .	38
2.11	Redução do composto resazurina para resafurina para testar a viabilidade celular.	39

3.1	Imagens de Microscopia Óptica das matrizes de nanofibras M0,M200:1, M100:1 e M50:1. . . . .	42
3.2	Representação gráfica da condutividade em função da fracção de AgNO <sub>3</sub> para PVP . . . . .	43
3.3	Imagens de Microscopia electrónica de varrimento das matrizes de nanofibras. . . . .	44
3.3	Imagens de Microscopia electrónica de varrimento das matrizes de nanofibras. . . . .	45
3.4	Grau de inchamento e perda de massa dos filmes e matrizes em função dos tempos de irradiação UV. . . . .	47
3.5	Fotografia das matrizes M200:1,M100:1 e M50:1 após submetidas a 4 horas de radiação UV. . . . .	48
3.6	Fotografia da célula de quartzo com filme F100:1 sujeito a diferentes tempos de irradiação UV. . . . .	48
3.7	Espectros de UV-Vis dos diferentes filmes após terem sido irradiados com radiação UV. . . . .	50
3.8	Representação gráfica da absorvância e do c.d.o em função dos tempos de exposição a radiação UV dos diferentes filmes. . . . .	51
3.9	Espectro de UV-vis para detectar a presença de nanopartículas de prata (NPs) libertadas para água do filme F100:1. . . . .	52
3.10	Matriz M0 e M100:1 em água depois de reticuladas 4 horas. . . . .	52
3.11	Medições de espectrofotometria de UV-vis do meio líquido em contacto com matrizes de nanofibras depois de irradiadas por 4 h. . . . .	53
3.12	Absorvâncias do meio líquido onde se encontram imersas matrizes de nanofibras com NPs em função do tempo de imersão. . . . .	54
3.13	Imagens de TEM das diferentes matrizes de nanofibras M200:1, M100:1 e M50:1 após 240 minutos de exposição a radiação UV . . . . .	57
3.13	Imagens de TEM das diferentes matrizes de nanofibras M200:1, M100:1 e M50:1 após 240 minutos de exposição a radiação UV . . . . .	58
3.14	Representação gráfica do tamanho médio das NPs observadas nas fibras da matriz M100:1 em função do tempo de exposição a radiação UV. . . . .	60
3.15	Imagens de TEM de fibras correspondentes à matriz M100:1 irradiada diferentes tempos com UV. . . . .	61
3.15	Imagens de TEM de fibras correspondentes à matriz M100:1 irradiada diferentes tempos com UV. . . . .	62
3.16	Apresentação dos resultados do primeiro ensaio para o teste de MIC . . . . .	64
3.17	Representação gráfica da D <sub>600</sub> e da concentração celular dos resultados obtidos no primeiro ensaio em função da variação das massas de M100:1 . . . . .	65
3.18	Evidência do efeito bacteriostático da matriz M100:1 com NPs incorporadas sobre as culturas da estirpe <i>S.aureus</i> . . . . .	66

3.19	Comparação dos resultados obtidos com e sem a matriz M100:1 (25mg) com NPs incorporadas sobre a cultura bacteriana de <i>S.aureus</i> , ao fim de 24 horas. .	67
3.20	Representação gráfica dos valores da DO <sub>600</sub> e da CFU/ml para as culturas na ausência e na presença de M100:1 ao longo das 24 horas de medições. . . . .	67
3.21	Resultados dos testes de susceptibilidade dos diferentes microrganismos às matrizes de nanofibras com NPs incorporadas obtidos pelo método de Kirby-Bauer	71
3.21	Resultados dos testes de susceptibilidade dos diferentes microrganismos às matrizes de nanofibras com NPs incorporadas obtidos pelo método de Kirby-Bauer	72
3.22	Resultados obtidos nos testes de citotoxicidade pelo método de contacto directo com as diferentes matrizes. . . . .	74
3.23	Imagens de SEM das células semeadas nas matrizes após terem sido fixadas .	76
A.1	Hemocitómetro . . . . .	88



# Lista de tabelas

1.1	Parâmetros que influenciam o processo de electrofiação . . . . .	8
2.1	Produtos químicos utilizados para a preparação das soluções poliméricas . . .	21
2.2	Constituição das soluções poliméricas utilizadas . . . . .	22
2.3	Tempos de irradiação UV das amostras para TEM. . . . .	28
2.4	Tempos de irradiação UV dos filmes para realização da espectrofotometria de UV-Visível . . . . .	29
2.5	Estirpes de microrganismos utilizadas no trabalho. . . . .	31
2.6	Constituição percentual dos meios de cultura líquidos LB e LA. . . . .	31
2.7	Constituição percentual dos meios de cultura líquidos YM e YMA. . . . .	32
2.8	Origem dos constituintes dos meios de cultura. . . . .	32
3.1	Parâmetros utilizados na electrofiação das soluções poliméricas. . . . .	41
3.2	Condutividade das soluções poliméricas. . . . .	42
3.3	Diâmetros das nanofibras nas diferentes matrizes. . . . .	43
3.4	Representação do tamanho das NPs presentes nas matrizes de nanofibras. . .	56
3.5	Ensaio realizados para testar a susceptibilidade dos microrganismos em relação às nanopartículas de prata. . . . .	63
3.6	Resultados obtidos visualmente nos ensaios para a determinação do valor da MIC . . . . .	64
3.7	Resultados da evolução da turvação da cultura bacteriana de <i>S.aureus</i> em função do tempo na presença e na ausência da matriz M100:1. . . . .	66
3.8	Massas dos discos das matrizes de nanofibras com 10 mm utilizados nos testes de difusão pelo método de Kirby-Bauer. . . . .	69
3.9	Resultados dos testes de difusão pelo método de Kirby-Bauer realizados com diferentes estirpes de bactérias. . . . .	69
3.10	Massa dos discos de matrizes de nanofibras utilizados para os testes de citotoxicidade. . . . .	73
3.11	Resultados das medições de fluorescência efectuados ao meio celular após a realização do teste de citotoxicidade pelo método de contacto directo. . . . .	74

3.12 Resultados das medições de fluorescência efectuados ao meio celular após a realização do teste de citotoxicidade pelo método de adesão celular. . . . .	75
--	----

# Capítulo 1

## Enquadramento Teórico

### 1.1 Introdução

Esta dissertação foi desenvolvida no âmbito do Mestrado Integrado em Engenharia Biomédica, na área da Engenharia dos Tecidos (ET). A Engenharia dos Tecidos recorre a várias técnicas para a fabricação matrizes porosas que possam facilitar a regeneração dos tecidos biológicos lesados. A escolha da técnica e dos biomateriais utilizados na sua produção deve ter em conta as características específicas do tecido a regenerar.

Entre os materiais usados destaca-se a classe dos polímeros, tanto de origem sintética como natural. O requisito essencial é que sejam biocompatíveis. Preferencialmente devem ainda ser biodegradáveis. O recurso a matrizes porosas 3D semelhantes à matriz extra celular (MEC) dos tecidos biológicos (matrizes biomiméticas) suporta a adesão das células e promove a sua proliferação durante o processo regenerativo.

A utilização de materiais biodegradáveis torna a presença destes materiais de suporte temporários. Durante a regeneração as matrizes podem ainda assegurar algumas funções do órgão lesado. Por exemplo, no caso da regeneração da pele podem servir de barreira à penetração de microrganismos.

Neste contexto, a ET tem procurado desenvolver coberturas de feridas crónicas e queimaduras extensas com propriedades biocidas ou bioestáticas. Uma estratégia que tem vindo a ser considerada para conferir estas propriedades às coberturas é a incorporação de nanopartículas de prata (NPs) nas matrizes. As NPs podem ser produzidas a baixo custo e têm um largo espectro de acção, incluindo fungos e bactérias que não manifestam desenvolver resistência ao seu efeito.

Um dos métodos para a produção de matrizes biomiméticas é a electrofiação, uma técnica simples e de baixo custo. Esta técnica permite obter, a partir de soluções poliméricas, matrizes de fibras com diâmetros da ordem das dezenas de nanómetros até alguns microns.

A PoliVinilPirrolidona (PVP) é um polímero biocompatível, sintético e hidrofílico. A hidroflicidade é um aspecto importante para uma cobertura de pele pelo papel que desempenha na correcta manutenção do exsudado. Não obstante a vantagem do PVP ser um

polímero hidrofílico, o facto de ser solúvel em água compromete à partida a viabilidade da sua escolha para esta aplicação. Este problema pode ser ultrapassado pela exposição do PVP a radiação Ultra-Violeta (UV): a irradiação do polímero conduz à reticulação entre cadeias poliméricas o que o torna insolúvel.

Os processos de produção de NPs envolvem a redução de iões de prata provenientes de um sal. Pelo seu baixo custo e fácil acesso, a escolha recai usualmente no nitrato de prata ( $\text{AgNO}_3$ ). O tamanho das NPs depende do número de átomos que agregam e que pode ser estabilizado por determinadas substâncias. A presença de PVP em soluções que contêm  $\text{AgNO}_3$  estabiliza as NPs.

Vários grupos têm investigado a produção de matrizes de nanofibras poliméricas com NPs incorporadas. Para além da formação de soluções já com nanopartículas incorporadas, é possível induzir a formação das NPs em matrizes de nanofibras produzidas a partir de soluções contendo  $\text{AgNO}_3$ , por aquecimento das matrizes [Dong et al., 2010] ou pela sua exposição a radiação UV [Son et al., 2006]. Neste trabalho utilizou-se este último método.

Este trabalho teve como objectivo produzir matrizes de nanofibras de PVP com NPs incorporadas e avaliação do seu potencial biocida e da sua toxicidade. Para tal foi estabelecido o seguinte plano de trabalhos:

- Produção de matrizes de nanofibras pelo processo de electrofiação;
- Reticulação do PVP e produção de NPs através da exposição a radiação UV;
- Avaliação da estabilidade dos materiais irradiados em água;
- Utilização de espectrofotometria UV-Vis para o estudo da presença de NPs nos materiais irradiados e avaliação da taxa de libertação das NPs das matrizes de nanofibras para água;
- Caracterização das NPs formadas através de Microscopia Electrónica de Transmissão;
- Execução de testes microbiológicos com bactérias e fungos para averiguar o efeito biocida das matrizes com NPs;
- Realização de culturas celulares para estudar o efeito citotóxico das matrizes com NPs.

A dissertação está dividida em quatro capítulos: Introdução, Materiais e Métodos, Resultados e Discussão e Conclusões.

O capítulo 1 introduz os vários temas afins ao trabalho. Depois do enquadramento que anteriormente foi feito, apresentam-se de seguida os objectivos e os ingredientes da Engenharia de Tecidos. Segue-se uma descrição da técnica usada na produção das matrizes de nanofibras – a electrofiação – e discutem-se os parâmetros de que depende. Por fim, contextualiza-se o crescente interesse no estudo das NPs nas propriedades dos materiais à nanoescala, considerando não só as possibilidades que oferecem como também os seus efeitos citotóxicos.



No capítulo 2 faz-se uma descrição de todos os procedimentos experimentais e materiais utilizados. Apresenta-se como foi realizado o processo de electrofiação para a produção das matrizes de nanofibras e são explicados o método de reticulação destas matrizes bem como os testes efectuados para avaliação da sua eficiência. Explica-se como através da espectrofotometria de UV-vis se estudou a formação de NPs em filmes e a libertação de NPs de matrizes de nanofibras para água e como se caracterizou com recurso a imagens de TEM a forma, tamanho e quantidade de NPs nas nanofibras. Finalmente descrevem-se os testes microbiológicos efectuados para testar os efeitos biocidas das matrizes (determinação da concentração mínima inibitória e testes de difusão pelo método de Kirby-Bauer) e as culturas celulares realizadas com o objectivo de avaliar a toxicidade das matrizes poliméricas produzidas.

No capítulo 3 são apresentados e discutidos os resultados obtidos ao longo do trabalho experimental. Começa-se pelos resultados relativos à electrofiação das soluções poliméricas e caracterização morfológica das matrizes obtidas. Apresentam-se depois os resultados correspondentes ao processo de reticulação por irradiação UV e formação simultânea das NPs que são depois caracterizadas por medições de espectrofotometria de UV-vis avaliando-se ainda a sua libertação a partir das matrizes de nanofibras para água. A análise de imagens TEM das matrizes de nanofibras com NPs incorporadas completa a caracterização das partículas produzidas a partir das diferentes soluções consideradas e expostas a diferentes tempos de exposição a radiação UV. Apresentam-se por fim os resultados dos testes microbiológicos e dos testes de citotoxicidade.

Por último, o capítulo 4 apresenta algumas conclusões do trabalho realizado e as perspectivas futuras para o desenvolvimento do mesmo.

## 1.2 Engenharia dos Tecidos

Por vezes a falência de um órgão só pode ser colmatada pela sua substituição. O transplante de órgãos levanta algumas dificuldades tanto ao nível da procura de um dador como ao nível da incompatibilidade após o processo de transplantação.

Com o progresso da Medicina Regenerativa têm vindo a ser desenvolvidas novas técnicas que auxiliam na resolução de problemas ao nível da regeneração de tecidos lesados. A Engenharia dos Tecidos (ET) procura contribuir para a resolução destes problemas com soluções que ajudem a recriar ambientes celulares propícios à regeneração dos tecidos e ao restabelecimento das suas funções.

A pele é o maior órgão do corpo humano e possui um vasto conjunto de funções. Tem o papel de barreira, impedindo a entrada de microrganismos e a saída de líquidos do corpo humano. Assim, quando uma lesão grave na pele pode conduzir a uma infecção generalizada. As lesões da pele podem ser causadas por queimaduras, traumas e úlceras devido a diabetes ou pressão (recorrente em acamados). Para minimizar ou mitigar os danos provocados por estas situações têm sido desenvolvidas coberturas para feridas que ajudam na regeneração

celular e protegem a ferida contra a acção de microrganismos. Estas coberturas são estruturas de suporte que respeitam a bicamada celular da pele; que para além das sua acção protectora absorvem o exsudado da ferida e promovem o crescimento e proliferação celular [Zilberman, 2011].

A regeneração dos tecidos a partir de suportes biocompatíveis e biodegradáveis tem vindo a ser desenvolvido pela ET. Vários ingredientes são considerados na produção destes suportes (ver figura 1.1), nomeadamente: biomateriais utilizados e estrutura de fabricação, combinação de células viáveis, incorporação de biomoléculas e maturação da estrutura em biorreator. Desta forma pretende-se desenvolver uma estrutura igualável à dos tecidos de modo a promover uma melhor reparação celular [Fisher et al., 2011].

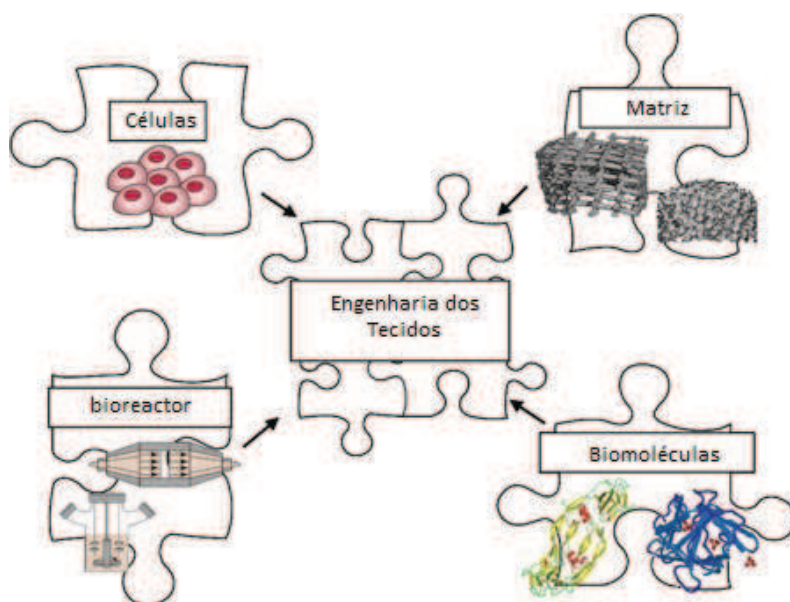


Figura 1.1: Representação de alguns dos ingredientes considerados em ET; adaptado de [Gualandi, 2011].

Na figura 1.3 esquematiza-se o processo de desenvolvimento do tecido prévio a um implante: as células são cultivadas “in vitro” numa matriz que constitui um suporte poroso onde podem proliferar e dar origem a novo tecido biológico. Seguidamente, a matriz é colocada no corpo humano.

Após o implante, sendo a matriz constituída por um material biocompatível e biodegradável, a matriz degrada-se e é reabsorvida pelo organismo à medida que é substituída pelo tecido [Chu and Liu, 2008, Fisher et al., 2011, Gualandi, 2011].

O conhecimento da função e estrutura dos tecidos biológicos é muito importante para a ET estabelecer a estratégia a adoptar. Normalmente os tecidos biológicos são compostos por células e por uma parte “não-celular”, chamada “Matriz Extra Celular” (MEC). A MEC ajuda à proliferação e à agregação celular, sendo um suporte onde as células podem aderir

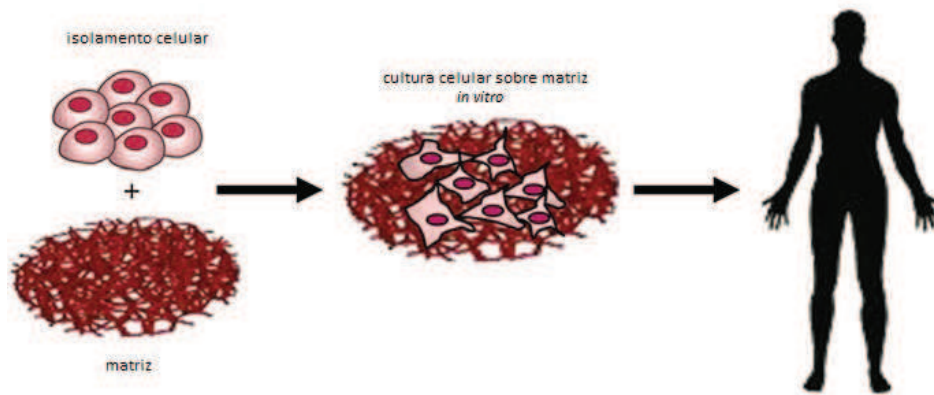


Figura 1.2: Abordagem da ET pela utilização de matrizes celularizadas para fins terapêuticos; adaptado de [Gualandi, 2011].

e interagir entre si. A MEC tem como principais funções o suporte e orientação celular, o controlo do crescimento celular e manutenção da diferenciação celular e da arquitectura do tecido [Gualandi, 2011, Ratner, 1996].

Uma matriz desenvolvida no âmbito da ET deverá ter um papel de suporte semelhante, oferecendo a possibilidade da migração e interacção das células entre si ou a moléculas bioactivas que promovem a regeneração os tecidos. Para que uma matriz desempenhe este papel correctamente deve respeitar certos aspectos como [Gualandi, 2011]:

- ser biocompatível e biodegradável;
- ter propriedades mecânicas consistentes com os tecidos saudáveis circundantes e com o tecido que vai ser reparado, de forma a ser capaz de substituir a função mecânica do tecido lesado, facilitando o processo de regeneração;
- sofrer degradação de acordo com o tempo de formação do tecido a regenerar;
- apresentar propriedades de superfície que favoreçam a proliferação e diferenciação celular para promover a formação da MEC;
- possuir propriedades arquitectónicas que ajudem à proliferação e ao estabelecimento das comunicações celulares, nomeadamente tamanho do poro e interconectividade entre poros, que promova de uma forma eficaz a entrega de nutrientes e metabólitos e uma boa remoção de lixo.

No caso da pele, as matrizes devem estar preparadas para suportar as forças de contracção que existem nas zonas de feridas. O grau de remodelação depende do tecido (pele, 4-6 semanas) e da sua anatomia e fisiologia [Chu and Liu, 2008].

As características acima descritas das matrizes estão estritamente relacionadas com factores que interferem e controlam as suas propriedades: tipo de polímero e tecnologia de fabricação.

### 1.3 Biomateriais

Na Conference of the European Society for Biomaterials foi proposta a seguinte descrição de biomaterial: “uma substância ou conjunto de substâncias, sintéticas ou naturais que podem ser utilizadas em qualquer período de tempo, como um todo ou parte do sistema que irá tratar ou repor tecido, órgão ou função do corpo humano”. Aos biomateriais é exigido serem biocompatíveis e biodegradáveis de forma a que tanto os dispositivos a que dão origem, como os produtos da sua degradação, provoquem o mínimo de reacções alérgicas ou inflamatórias por parte do organismo [Saltzman, 2004]. Em geral, os biomateriais possuem propriedades de degradação enzimática e/ou hidrolítica e os seus produtos de degradação podem ser absorvidos pelo organismo [Ratner, 1996].

Os biomateriais podem ser agrupados pela a sua constituição química: polímeros, metálicos, cerâmicos ou compósitos. Dentro da classe dos polímeros, os polímeros sintéticos são estes mais baratos, mais fáceis de obter e com uma maior especificidade o que permite ultrapassar alguns problemas de desadequação a determinada aplicação dos polímeros naturais (por exemplo fracas propriedades mecânicas) [Gualandi, 2011, Ratner, 1996].

### 1.4 Matrizes de nanofibras obtidas por electrofiação

A electrofiação (ES, do inglês *electrospinning*) é uma técnica de baixo custo, que permite, a partir de soluções poliméricas, produzir matrizes de fibras com o diâmetro na ordem das dezenas de nanómetros até alguns microns [Chu and Liu, 2008, W.N, 2009]. A técnica de ES permite obter matrizes de nanofibras com características únicas. A sua estrutura é semelhante à MEC dos tecidos a reparar, tem grande porosidade e capacidade de suportar a adesão, a proliferação e crescimento celulares [Greiner and Wendorff, 2007].

O diâmetro, morfologia e organização das fibras podem ser controlados no processo de ES, tendo em conta diferentes parâmetros, entre os quais: propriedades intrínsecas da solução, condições do processo e as condições ambientais [Chu and Liu, 2008]. As matrizes de nanofibras têm vindo a ser exploradas na ET por possuírem características bastante atractivas, tais como a alta porosidade e a elevada razão área de superfície/volume. Apesar da disposição interconectada dos poros, o tamanho reduzido dos mesmos constitui um obstáculo à infiltração celular. Para o desenvolvimento de substitutos de pele o reduzido tamanho do poro constitui uma vantagem no que diz respeito ao efeito protector a invasões de microrganismos.

### 1.4.1 Processo de Electrofiação

A técnica de electrofiação (figura 1.3) utiliza como principais componentes uma fonte de alta tensão, uma seringa com um capilar metálico (agulha), um colector metálico e uma bomba ejectora.

A solução polimérica a utilizar é previamente introduzida na seringa e esta é colocada na bomba ejectora. A bomba ejectora estabelece um caudal (também referido como fluxo) constante a que a solução polimérica é ejectada da agulha. O eléctrodo positivo da fonte de alta tensão encontra-se ligado à agulha, enquanto o colector metálico está ligado à terra. Desta forma, ao ser aplicada a alta tensão à agulha a solução polimérica fica carregada positivamente e é estabelecida uma diferença de potencial entre a agulha e o colector metálico, isto é, no espaço entre a agulha e o colector passa a existir um campo eléctrico que aponta na direcção do colector. À medida que a intensidade do campo eléctrico aumenta, a gota de solução polimérica na ponta do capilar adquire um formato cónico, designado por cone de Taylor. Quando o valor do campo eléctrico iguala ou ultrapassa um valor crítico, a força eléctrica repulsiva supera a força da tensão superficial da gota. Neste momento forma-se um jacto de solução polimérica. O jacto carregado positivamente é acelerado pelo campo eléctrico no sentido do colector metálico. Durante o caminho percorrido pelo jacto no ar, a repulsão electrostática entre elementos adjacentes do jacto é responsável pelo estiramento a que se opõem as forças viscoelásticas. Ao mesmo tempo o solvente da solução polimérica vai evaporando e são depositadas fibras sólidas no colector metálico (ver figura 1.4). No final, sobre a superfície do colector metálico, ficam depositadas nanofibras sólidas orientadas aleatoriamente que formam uma matriz de nanofibras [Cengiz et al., 2009, Dabirian et al., 2011, W.N., 2009].

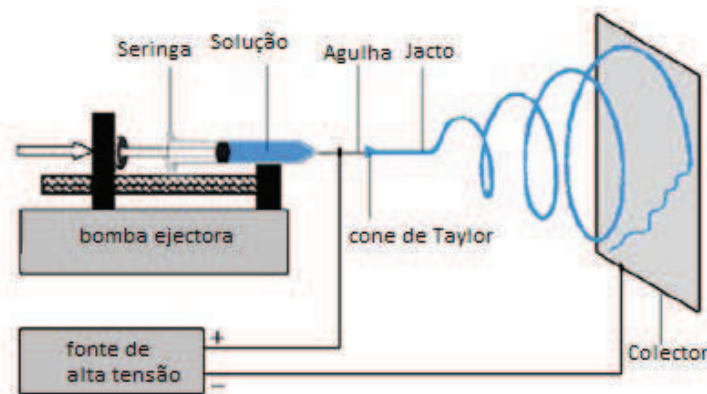


Figura 1.3: Esquematização do processo de electrofiação; adaptado de [W.N., 2009].

### 1.4.2 Parâmetros que influenciam o processo de electrofiação

Na tabela 1.1 estão apresentados os vários parâmetros que influenciam o processo de ES e ,posteriormente, é explicada resumidamente a influência de cada parâmetro nas fibras

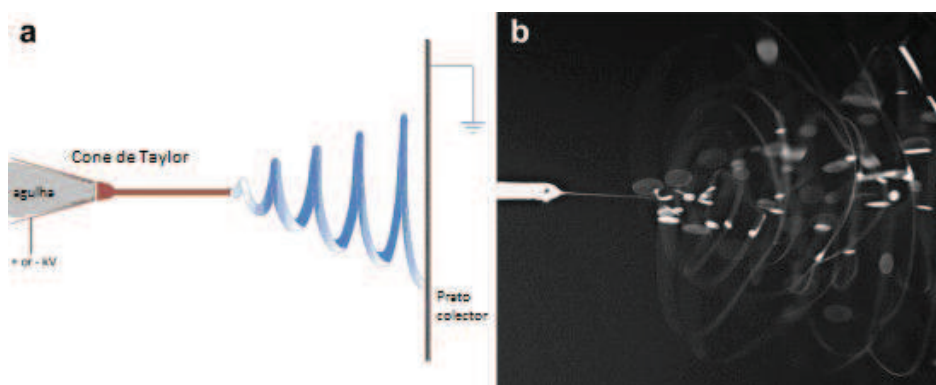


Figura 1.4: Ilustração esquemática do percurso do jacto de solução polimérica no processo de electrofiação; adaptado de [Dabirian et al., 2011].

obtidas, através da relação do modo de actuação e os efeitos causados nas fibras produzidas [Gouma, 2010, Ramakrishna, 2005, Stanger Jon and Mark, 2005].

Tabela 1.1: Parâmetros que influenciam o processo de electrofiação; adaptado de [Stanger Jon and Mark, 2005].

Parâmetros da solução	Parâmetros do processo	Condições Ambientais
Concentração	Tensão aplicada à agulha	Temperatura
Viscosidade	Força do campo eléctrico	Humidade
Tensão de superficial	Forma do campo eléctrico	
Condutividade	Caudal	
Volatilidade do solvente	Diâmetro da agulha	

No processo de ES os efeitos causados por cada parâmetro depende do sistema polímero-solvente usado. Ainda que as propriedades da solução permitam a electrofiação, o processo só ocorre com sucesso em certos intervalos do conjunto de parâmetros do processo e condições ambientais. Desta forma, para cada sistema polímero-solvente é sempre necessário otimizar os parâmetros da solução e do processo de modo a obter nanofibras com as características desejadas. O processo de optimização é difícil e demorado, pois é necessário ter em conta a variedade dos parâmetros e a relação entre eles para a obtenção de fibras com boa qualidade. Desta forma, entender o modo de actuação de cada parâmetro facilita este processo de optimização.

### Parâmetros da Solução

**Concentração da solução** A concentração de uma solução polimérica que permite a sua fiação relaciona-se com a massa molecular (Mw) do polímero. Ambas influenciam a viscosidade da solução polimérica. Por exemplo, se escolhermos uma Mw baixa de um polímero, para obter uma solução com determinada viscosidade, é necessária uma



concentração maior do que a que seria necessária se se escolhesse uma Mw mais elevada. Para determinado valor de Mw, com o aumento da concentração polimérica, aumentará também a viscosidade da solução.

**Viscosidade** A viscosidade está relacionada com o cruzamento das cadeias de moléculas na solução polimérica e depende da concentração da solução polimérica e da Mw do polímero. O aumento da viscosidade confere ao jacto da solução uma maior capacidade de resistir a ser estirado sem se partir. A partir de determinado valor da viscosidade é possível aplicar uma tensão capaz de produzir um jacto estável e produzir fibras sem contas. O aumento da viscosidade da solução (por exemplo por aumento da concentração do polímero) leva à formação de fibras com diâmetro superior. Uma viscosidade demasiado elevada pode dificultar a saída de solução polimérica da agulha.

**Tensões Superficial** As moléculas presentes no interior do líquido são atraídas em todas as direcções pelas moléculas vizinhas, pelo que a força resultante é nula. No entanto, o mesmo não acontece nas moléculas à superfície do líquido. Neste caso a atracção ocorre apenas no sentido do interior do líquido, gerando-se um excesso de energia associado às moléculas superficiais, o qual se traduz na tensão superficial. No processo de ES, quando a solução polimérica entra em contacto com o ar existe uma tendência para a tensão superficial reduzir a superfície exposta do fluído conduzindo à formação de uma gota. O campo eléctrico é o responsável pela deformação da gota e pela emissão do jacto. Se a tensão superficial for demasiado elevada podem formar-se aglomerados esféricos, designados por contas, ao longo da fibra. O aumento da tensão superficial conduz ao aumento do diâmetro das fibras produzidas.

**Condutividade** O aumento da condutividade da solução polimérica permite que exista uma maior quantidade de cargas transportadas pela fibra, sendo maior a repulsão de elementos adjacentes da mesma. Neste caso, maior será o estiramento da fibra e mais finas serão as fibras depositadas. Por vezes, quando a condutividade da solução é muito elevada pode ocorrer a formação de mais do que um jacto devido à elevada repulsão electrostática. Tal como a diminuição da tensão superficial da solução polimérica também o aumento da sua condutividade provoca a diminuição do diâmetro das fibras e a quantidade de contas nas fibras.

**Volatilidade** A taxa de evaporação do solvente nas condições ambientais de realização do processo de electrofiação deve permitir que durante o tempo de voo do jacto, desde a agulha até ao colector, o solvente evapore e a fibra se deposite seca.

#### Parâmetros do Processo

**Voltagem ou tensão** A diferença de potencial entre a agulha e o colector leva à criação de um campo eléctrico que promove a inicialização do jacto e do processo de ES. Num

sistema polímero-solvente existe um valor mínimo de tensão aplicada que permite iniciar o jacto e a formação de fibra. A partir deste valor, o aumento da tensão aplicada conduz à redução dos diâmetros das fibras obtidas devido a provocar um aumento de carga transportada pela fibra. A tensão aplicada deve ter em conta a viscosidade da solução polimérica. No caso de viscosidades reduzidas e altos valores de tensão pode ocorrer a formação de jactos secundários na ponta da agulha, ou até mesmo a quebra do jacto que se pode tornar muito instável. A diferença de potencial também tem efeito no tempo de voo do jacto, desde a agulha até ao colector. Com a diminuição da diferença de potencial, o campo eléctrico torna-se menos intenso e a aceleração do jacto é reduzida. Nesta situação, o tempo de voo aumenta, oferecendo à fibra mais tempo para se alongar, originando fibras com diâmetros mais finos.

**Caudal** O caudal é estabelecido pela bomba ejectora e determina a quantidade de solução polimérica disponível para a formação da fibra. O aumento do fluxo provoca o aumento do diâmetro das fibras, pois mais solução fica disponível para ser fiada. Se o fluxo for demasiado elevado e o tempo de voo não ser suficiente para que ocorra a evaporação total dos solventes, pode haver fusão de fibras que chegam húmidas ao alvo.

**Diâmetro da agulha** Com a redução do diâmetro da agulha, maior é a intensidade do campo eléctrico sentido pela solução polimérica na ponta da agulha. Por conseguinte, para uma mesma tensão aplicada, quanto menor for o diâmetro da agulha menor a probabilidade de formação de gota.

**Distância entre a agulha e o colector** Esta distância relaciona-se com o tempo de voo da fibra. O aumento da distância aumenta o tempo de voo. Durante o tempo de voo entre a agulha e o colector é necessário que ocorra a evaporação total dos solventes para uma posterior deposição de fibras secas, deste modo a distância escolhida deve ter em conta a taxa de evaporação do solvente. Se as fibras ao serem depositados ainda possuírem parte do solvente, pode ocorrer a fusão das fibras.

### Condições Ambientais

**Temperatura** Com o aumento da temperatura, a taxa de evaporação do solvente aumenta, influenciando a viscosidade da solução polimérica ao longo do tempo de voo.

**Humidade** A humidade ambiental é um parâmetro importante no caso da utilização de soluções aquosas. A humidade relativa é medida relativamente à quantidade de vapor de água na atmosfera. Deste modo, este parâmetro determina a taxa de evaporação dos solventes de base aquosa de uma solução polimérica. Quando a percentagem de humidade relativa é baixa, mais rápida será a evaporação do solvente de uma solução aquosa. Quando a humidade aumenta, maior a probabilidade da água condensar na



superfície da fibra durante o processo. Assim, este parâmetro poderá influenciar a morfologia da fibra com a formação de poros nas fibras.

### 1.4.3 Matrizes de nanofibras com propriedades antisépticas

As matrizes de nanofibras produzidas para aplicações cutâneas, devem possuir propriedades antissépticas que previnam contra a acção de microrganismos invasores, reduzindo a probabilidade do aparecimento de infecções. Deste modo, têm vindo a ser desenvolvidas matrizes com propriedades antisépticas. Estas propriedades biocidas podem ser obtidas através da incorporação de partículas metálicas que possuam características antimicrobianas.

Os compostos metálicos à base de prata, como as Nanopartículas de Prata (NPs), têm vindo a ser utilizados em várias aplicações na biomedicina devido às suas propriedades de largo espectro antimicrobiano. Um dos métodos para obter matrizes de nanofibras com NPs incorporadas é fiar uma solução polimérica coloidal na qual permanecem NPs em suspensão, ou uma solução com um sal metálico dissolvido. No último caso, as NPs são obtidas por redução de iões de prata na matriz, por exemplo, quando esta é exposta a radiação UV [Son et al., 2006] ou submetida a aquecimento [Dong et al., 2010]. Usualmente recorre-se à utilização do nitrato de prata ( $\text{AgNO}_3$ ) como fonte destes iões, devido ao seu baixo custo e fácil acesso.

## 1.5 Microbiologia

### 1.5.1 Bactérias

As bactérias são organismos procariontes, unicelulares, na sua maioria com um cromossoma circular. Pertencem ao domínio homónimo Bacteria (ou Eubacteria) do reino Monera [Black, 2008]. Estes microrganismos tanto podem viver em meios oxigenados (aeróbias) como na ausência de oxigénio (anaeróbias) ou ainda ser aeróbias facultativas [Kayser, 2005].

As bactérias podem dividir-se em dois conjuntos designados por Gram-positivas e Gram-negativas (positivas e negativas no teste de GRAM) [Prescott and Klein., 2002]. Uma das diferenças reside na constituição da parede celular, mais propriamente no peptidoglicano (ver figura 1.5).

O peptidoglicano é o componente mais importante na parede celular dos procariontes, o qual confere rigidez à parede celular das bactérias determinando a sua forma e evitando a lise celular. Nas bactérias Gram-positivas a parede celular apresenta uma camada espessa de peptidoglicano situada por cima da membrana citoplasmática, não existindo membrana exterior. Por outro lado, nas bactérias Gram-negativas o peptidoglicano encontra-se entre a membrana citoplasmática e a membrana exterior da bactéria [Black, 2008, Kayser, 2005, Prescott and Klein., 2002].

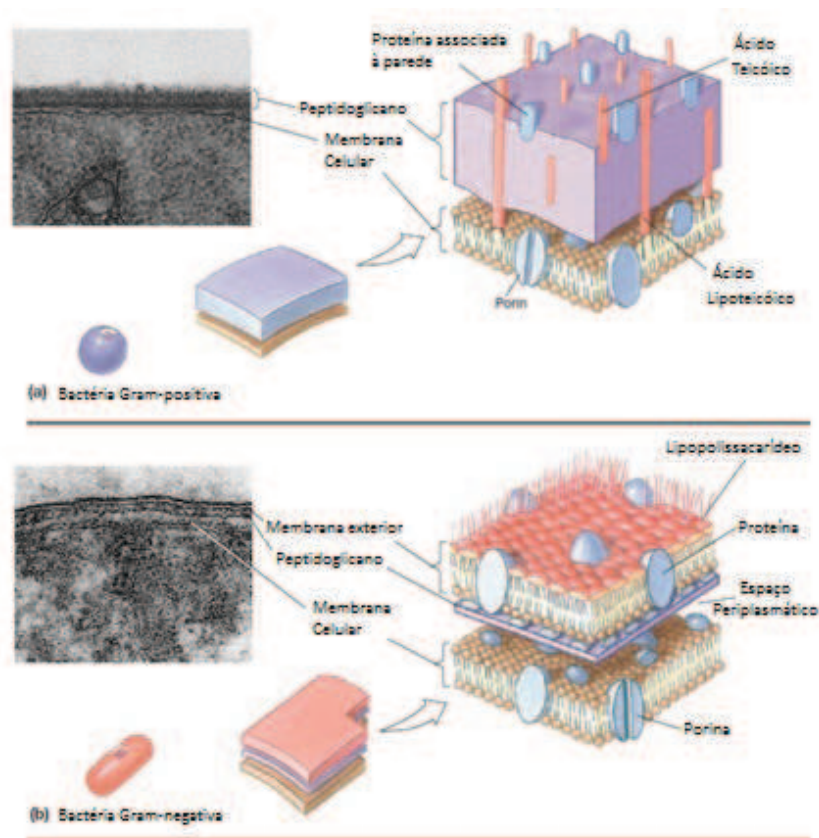


Figura 1.5: Estrutura da parede celular das bactérias a) Gram-positivas e b) Gram-negativas; adaptado de [Black, 2008].

### 1.5.2 Acção dos Antibióticos

Os antibióticos (antimicrobianos ou agentes bactericidas) alteram os processos e estrutura dos microrganismos. Podem ser eficazes contra uma grande ou pequena gama de agentes patogénicos, possuindo um largo ou reduzido espectro de actuação, respectivamente.

Os agentes bactericidas induzem à morte celular e os agentes bacteriostáticos inibem a proliferação celular (não ocorrendo a morte celular). Desta forma, os antibióticos possuem diferentes modos de acção, nomeadamente [Black, 2008, Prescott and Klein., 2002]:

- Inibição da parede celular: ajudam à ruptura da membrana celular do microrganismo e à lise celular;
- Inibição da síntese proteica (a) ou dos ácidos nucleicos (b) :
  - (a) Impede o crescimento dos microrganismos pela perturbação dos ribossomas ou pela interferência no processo de tradução;
  - (b) Interfere com a síntese de RNA (transcrição) ou DNA (replicação);

- Alteração das propriedades e da estrutura da membrana citoplasmática: solubilizam a membrana ou interferem com o transporte de substâncias para o interior ou exterior das células;
- Inibição de enzimas específicas;

### 1.5.3 Fungos

Os fungos são microrganismos eucariontes que pertencem ao domínio homónimo Eucarya e ao reino de Fungi. O elemento básico da constituição dos fungos é a hifa e o micélio. As paredes celulares dos fungos são constituídos por 90% de carboidratos e ricos em esteróis, que não se encontram noutras membranas biológicas [Kayser, 2005].

## 1.6 Nanopartículas de Prata como agente biocida

A descoberta de que as estruturas e o funcionamento dos biosistemas são da ordem dos nanómetros promoveu um melhoramento na investigação a nível biológico, biotecnológico e na medicina. Em particular, a nanotecnologia tem vindo a emergir no ramo da Ciência e Tecnologia no desenvolvimento de novos materiais à escala nanométrica, que apresentam um tamanho semelhante ao da maior parte das moléculas e estruturas biológicas [Stanger Jon and Mark, 2005]. Apesar destes desenvolvimentos, interessa ressaltar que a exposição dos seres humanos a nanomateriais, por exemplo através da inalação, ingestão ou contacto dérmico, pode aumentar a probabilidade de surgirem efeitos tóxicos [Ahamed et al., 2010, AshaRani et al., 2009].

A existência de estirpes de bactérias resistentes aos antibióticos actuais tornou-se um grave problema de saúde pública. Por consequência, tem vindo a crescer o incentivo para o desenvolvimento de novos bactericidas [Elichiguerra et al., 2005]. Particularmente, as nanopartículas de metais nobres, como as nanopartículas de prata (NPs), por possuírem propriedades anti-sépticas, actividade de largo espectro e por serem de baixo custo, têm sido alvo de estudo para o desenvolvimento de aplicações que previnam a acção de microrganismos [Castellano et al., 2007, Dong et al., 2010, Elichiguerra et al., 2005, Kim et al., 2007, Wu et al., 2009].

Nas últimas décadas, a prata e os sais de prata têm sido utilizados para diversas aplicações na medicina, principalmente no combate a infecções [Kim et al., 2007]. Numa fase inicial, o nitrato de prata ( $\text{AgNO}_3$ ) foi bastante utilizado, seguindo-se a sulfadiazina de prata e, recentemente, as NPs [Samberg et al., 2010, Wu et al., 2009].

As NPs são altamente tóxicas para os microrganismos, sendo o efeito biocida inversamente proporcional ao seu tamanho [Saltzman, 2004]. Na medicina podem ser utilizadas tanto no âmbito do ambiente hospitalar, como para fins terapêuticos. A nível hospital podem ser implementadas em dispositivos médicos devido à sua actividade antimicrobiana, como por exemplo no revestimento de máscaras cirúrgicas e em implantes [Kim et al., 2007, Li et al., 2006]. A nível terapêutico, as NPs são bastante eficientes como agentes bactericidas para combater ou prevenir infecções [Feng et al., 2000, Heunis and Dicks, 2010].

### 1.6.1 Mecanismos de acção sobre microrganismos

#### Mecanismo de acção das Nanopartículas de prata sobre bactérias

As NPs possuem propriedades antimicrobianas mais eficazes que a generalidade dos sais. Estas propriedades devem-se à grande área de superfície das NPs, que proporciona um melhor contacto com os microrganismos [Kim et al., 2007, Rai et al., 2009]. Adicionalmente, segundo Martínez-Castañón *et al*, quanto mais pequenas forem as NPs maior a sua actividade antimicrobiana no sentido em que maior é a superfície específica, aumentando a reactividade química e a actividade biológica [Martínez-Castañón et al., 2008].

Um efeito adicional de interacção entre bactérias e nanopartículas resulta da existência de forças electrostáticas. Concretamente, o pH verificado em meio biológico leva à formação de cargas negativas na parede celular das bactérias devido à dissociação do excesso de grupos carboxílicos (entre outros). Paralelamente, o contacto entre NPs forma na sua superfície cargas positivas, originando assim a referida interacção electrostática [Elichiguerra et al., 2005].

As NPs têm ainda grande afinidade com grupos fosfatos e com ligações sulfídicas (-SH). A membrana celular bacteriana contém na sua constituição proteínas (que estabelecem ligações -SH) e grupos fosfatos. Assim, a membrana celular é um dos locais de preferência para a actuação das NPs. Estas, ao estabelecer uma ligação à membrana podem provocar rupturas tornando a célula permeável, ocorrendo então a libertação do conteúdo intracelular para o exterior e, consequentemente, levando à lise celular [Amro et al., 2000, Kim et al., 2007, Sondi and Salopek-Sondi, 2004].

Ao interagir, as NPs podem penetrar para o interior da célula bacteriana. Neste caso, as bactérias mantêm o DNA na forma superenrolada dada a presença das NPs, comprometendo a sua replicação dada a necessidade que este se encontre (transientemente) no estado relaxado [Feng et al., 2000, Li et al., 2011]. A interacção das NPs com as bactérias pode também afectar a actividade metabólica através da inibição de actividades enzimáticas dada a sua grande afinidade por ligações -SH. Em particular, formam-se ligações entre proteínas, como é o caso de algumas enzimas intervenientes no metabolismo celular, tornando-as inactivas [Pommerville, 2010].

Finalmente, quando as células bacterianas entram em contacto com as NPs a multiplicação celular pode ser inibida (bacteriostáticos) ou ocorrer lise celular (bacteriolíticos) [Castellano et al., 2007].

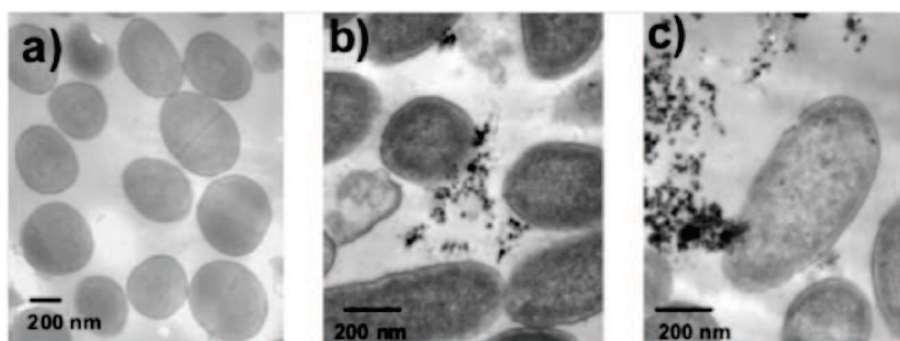


Figura 1.6: Imagens obtidas por TEM onde se visualiza efeitos das nanopartículas de prata sobre a bactéria *Pseudomonas aeruginosa*: perca da integridade da membrana celular e libertação de compostos intracelulares. (a) células de controlo (b) e (c) células tratadas com nanopartículas de prata; adaptado de [Elichiguerra et al., 2005].

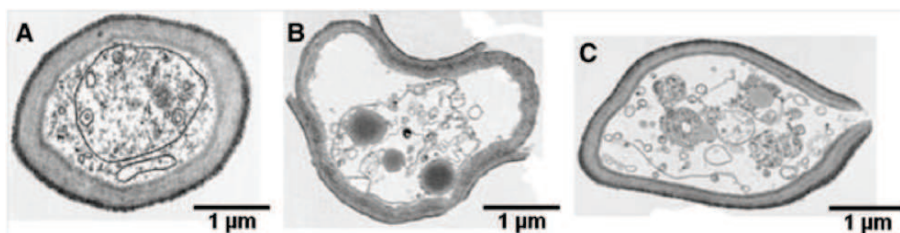
Quando as NPs entram em contacto com um meio húmido ocorre a formação de iões de prata ( $\text{Ag}^+$ ). Apesar de existirem numa pequena concentração, estes iões ajudam e intensificam o efeito biocida provocado pelas NPs. Os iões de prata exibem algumas formas de

actuação sobre as células bacterianas semelhantes às das NPs, podendo provocar a inibição ou lise celular. [Kim et al., 2007, Wu et al., 2009]. Contudo, existem algumas diferenças na reacção da célula perante os  $\text{Ag}^+$  e as NPs. Quando os  $\text{Ag}^+$  penetram para o interior da bactéria, a célula bacteriana possui mecanismos moleculares de protecção do DNA, impedindo que sofra lesões devido à presença de compostos nocivos. De facto, alguns estudos concluíram que os efeitos provocados pelas NPs são mais nocivos para os microrganismos que os  $\text{Ag}^+$  [Elichiguerra et al., 2005, Rai et al., 2009].

### Mecanismo de acção das nanopartículas de prata sobre fungos

Os fungos são células eucariontes (ver secção 1.5), à semelhança das células humanas. Como tal, é necessário ter em conta o modo de actuação dos antifúngicos, no sentido em que ao serem tóxicos para os fungos existe a possibilidade de o serem também para as células humanas [Black, 2008].

Kim *et al* (2009) estudaram o efeito das NPs nos fungos, em particular sobre a estirpe (*C.albicans*). Este grupo de investigação propôs que a principal actividade antifúngica das NPs se deve à destruição da integridade da membrana celular e à respectiva libertação de compostos intracelulares (ver figura 1.7).



**Figura 1.7:** *Imagens obtidas por TEM onde se visualizam os efeitos das nanopartículas de prata sobre o fungo Candida albicans: perda da integridade da membrana celular e libertação dos compostos intracelulares. (a) célula para controlo (b) e (c) célula colocada em meio com nanopartículas de prata; adaptado de [Kim et al., 2009].*

A interacção das NPs com a membrana celular perturba a sua bicamada fosfolipídica, surgindo poros à superfície da membrana que acabam com o potencial eléctrico e levam à saída de componentes intracelulares. Esta permeabilidade da célula e todos os efeitos que acarreta impossibilitam a existência de metabolismo celular, levando à lise celular.

As NPs também actuam ao nível fisiológico dos fungos, na medida em que interrompem o seu ciclo celular ao promover a paragem na fase  $G_2/M$ , impedindo assim a replicação do DNA e a replicação celular [Kim et al., 2009].

#### 1.6.2 Citotocidade

O efeito tóxico das NPs também pode ser sentido pelas células humanas [AshaRani et al., 2009]. Estudos realizados indicam que as NPs possuem efeitos tóxicos em várias linhas celulares de



diferentes órgãos humanos (pele, pulmões, rins, cérebro, sistema vascular, fígado e órgãos reprodutivos), provocando inibição da proliferação e viabilidade celular [Ahamed et al., 2010, AshaRani et al., 2009].

A mitocôndria é um dos organelos celulares mais importantes da célula, pois efectua funções vitais e sem a qual ocorre a lise celular. Esta acarreta um papel crucial na respiração celular, processando e convertendo energia sob a forma de moléculas de ATP [Prescott and Klein., 2002].

A principal causa da redução da viabilidade celular deve-se ao aumento da produção de espécies reactivas de oxigénio (ROS, do inglês *Reactive Oxygen Species*). Estas espécies muito reactivas provocam danos estruturais em certas proteínas importantes para o metabolismo celular e no próprio DNA. A figura 1.8 é representativa do mecanismo de interacção das NPs com as células.

Em condições fisiológicas favoráveis ao processo da respiração celular são produzidas ROS em baixas concentrações durante a fosforilação oxidativa. Estes possuem um papel importante na sinalização celular e normalmente são neutralizados por antioxidantes como a glutathione e enzimas antioxidantes.

Contudo, as NPs interagem com as mitocôndrias e alteram o seu funcionamento normal ao penetrarem para o interior da célula. Esta alteração induz à paragem da actividade da cadeia transportadora de electrões, tendo como consequências o aumento da concentração de ROS e a inibição da síntese de ATP. Neste momento ocorre um aumento exagerado na produção de ROS, diminuindo a capacidade de actuação dos agentes antioxidantes, que pode resultar em danos nos componentes celulares (proteínas, lípidos e DNA). Este fenómeno denomina-se por stress oxidativo.

O stress oxidativo pode provocar alterações no ciclo celular do DNA: paragem na fase G<sub>2</sub>/M impossibilitando a reparação do DNA (inibe multiplicação celular), ou a paragem na fase G<sub>1</sub> ocorrendo o bloqueio total na fase S (provoca a lise celular). Na figura 1.9 observa-se a distribuição das NPs no interior de células cancerígenas [Chun et al., 2010, Foldbjerg et al., 2011, Kruszewski et al., 2011].

As NPs dão origem a iões de prata ao entrarem em contacto com meio húmido, como é o caso do meio celular. De facto, estudos revelaram que os iões de prata também são causadores de stress oxidativo, podendo aumentar os efeitos genotóxicos e citotóxicos, apesar de o efeito tóxico das NPs ser mais pronunciado [Foldbjerg et al., 2011].

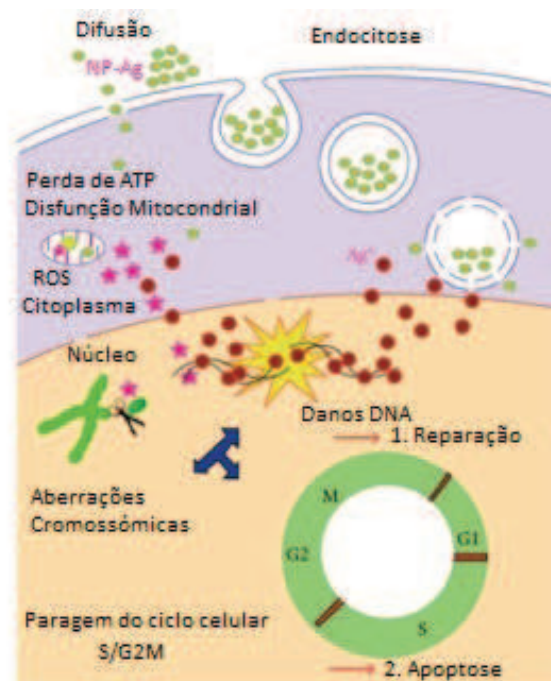


Figura 1.8: Representação dos mecanismos de acção das nanopartículas de prata sobre células eucariontes provocando a perda de viabilidade celular; adaptado de [Heunis and Dicks, 2010].

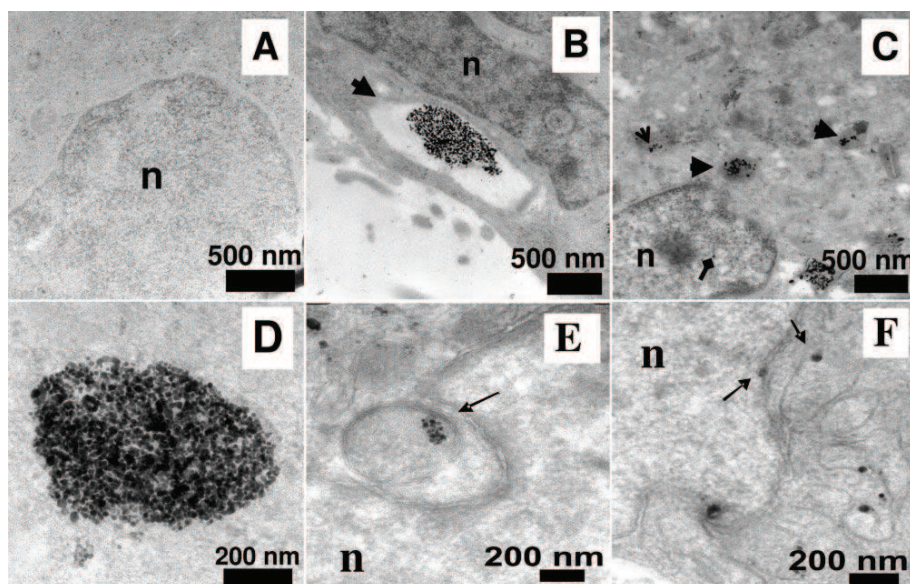


Figura 1.9: Imagens obtidas por TEM nas quais se observa a biodistribuição das NPs em células cancerígenas. A) células controlo sem tratamento com NPs, sem qualquer tipo de anormalidade; B) células tratadas com NPs: endossomas perto da membrana da celular com várias NPs no seu interior; C) NPs no interior de lisossomas (seta aberta), NPs espalhadas no citoplasma (seta fechada) e NPs no núcleo (seta ponta diamante); D) nanogrupos que mostram que o aglomerado é composto por NPs individuais em vez de aglomerados de células; E) endossomas com NPs no seu interior e presença de NPs em mitocôndrias e na membrana nuclear; adaptado de [AshaRani et al., 2009].



## 1.7 Polímeros

Os polímeros fazem parte dos compostos químicos que se distinguem pela sua repetição. Um polímero é formado por várias ligações (normalmente cinco ou mais) de unidades estruturais individuais (monómeros), resultantes de reacções químicas de polimerização, dando origem a uma macromolécula. O número de unidades estruturais repetidas numa macromolécula é chamado grau de polimerização [Saltzman, 2004].

### 1.7.1 PoliVinilPirrolidona

A PoliVinilPirrolidona, também conhecida por Povidona ou apenas PVP (ver figura 1.10), é um polímero sintético e solúvel em água obtido pela polimerização do monómero N-VinilPirrolidona (polimerização do monómero vinilpirrolidona) [Haaf et al., 1984]. A solubilidade do PVP em água pode ser reduzida através da reticulação por exposição a radiação Ultra-Violeta (UV) [Sionkowska et al., 2008].

Na reticulação (do inglês, *crosslinking*) formam-se ligações covalentes entre as cadeias poliméricas [Lopérgolo et al., 2003]. Durante o processo de irradiação UV as moléculas das cadeias poliméricas são inicialmente excitadas e, seguidamente, ocorre a quebra de cadeias e reticulação, que aumenta com o tempo de exposição. Este processo pode ser acelerado através de fotoiniciadores. Contudo, é importante referir que com um elevado tempo de exposição à radiação UV pode ocorrer a clivagem das cadeias poliméricas, podendo levar à degradação polimérica [Sionkowska et al., 2008].

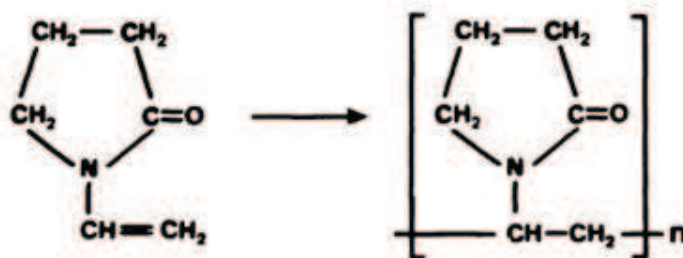


Figura 1.10: Polimerização do monómero VinilPirrolidona; adaptado de [Haaf et al., 1984].

### 1.7.2 PVP como estabilizador das nanopartículas de prata

Um estabilizador tem como finalidade a prevenção da aglomeração das partículas e muitas vezes são utilizados polímeros para desempenhar esta função. No caso deste trabalho utilizar-se-á como estabilizador o PVP.

A utilização de um estabilizador eficaz não só evita a aglomeração das nanopartículas de prata (NPs), como protege as partículas da solução. Esta protecção impede o aumento do seu tamanho, podendo ser uma desvantagem quando se pretende obter nanopartículas maiores

[Cao, 2004, Wang et al., 2005]. A formação do complexo entre PVP e prata é descrito na figura 1.11.

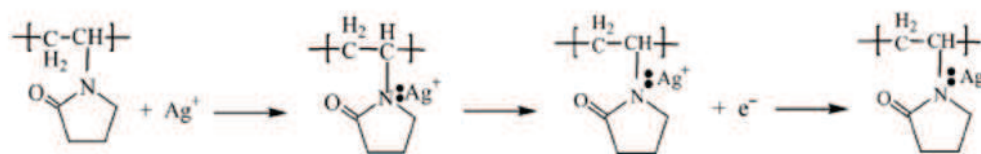


Figura 1.11: *Complexo formado entre o PVP e a prata; adaptado de [Wang et al., 2005].*

A principal razão para a protecção das NPs pelo PVP é a presença do grupo azoto ou amida (N) que se coordena com o ião de prata formando-se uma camada protectora à sua volta. Embora o pirrolidil tenha um efeito estérico <sup>1</sup> na coordenação entre o átomo de azoto e o ião de prata ( $\text{Ag}^+$ ), a electronegatividade do átomo de azoto é menor do que a do átomo de oxigénio, pelo que a sua capacidade de doar electrões é maior do que a do átomo de oxigénio. Desta forma, é o átomo de azoto que se coordena com os iões de prata [Wang et al., 2005].

<sup>1</sup>cada átomo dentro de uma molécula ocupa um determinado espaço

## Capítulo 2

# Procedimento Experimental

Neste capítulo são apresentados os materiais e descritos os procedimentos seguidos na produção de matrizes de nanofibras, para a síntese e detecção das nanopartículas de prata e nos testes microbiológicos e de citotoxicidade efectuados às matrizes com nanopartículas incorporadas.

### 2.1 Soluções Poliméricas

Foram utilizadas soluções poliméricas para a produção de filmes e de matrizes de nanofibras. Estas soluções foram produzidas a partir do polímero PoliVinilPirrolidona (PVP) e, utilizando como solventes, água destilada e etanol. Tendo em vista a incorporação das nanopartículas de prata, foi ainda utilizado nitrato de prata. Na tabela 2.1 estão apresentados os dados relativos a estes materiais.

Tabela 2.1: *Produtos químicos utilizados para a preparação das soluções poliméricas.*

Nome	Fórmula Química	Marca	Massa Molecular ( $M_w$ )
PVP	$(C_6H_9NO)_n$	Sigma Aldrich	3 000 000
Etanol	$CH_3CH_2OH$	Panreac	46,07
Nitrato de Prata	$AgNO_3$	Panreac	169,87

#### 2.1.1 Obtenção das soluções

A constituição das soluções usadas no trabalho está apresentada na tabela 2.2 . A solução base (S0) é constituída por 18% de PVP dissolvido numa mistura de etanol e água na proporção etanol:água de 1:3. A solução foi produzida sob agitação magnética (*Agimatic-s*, *J.P Selecta*, *SA*).

Para além da solução S0, outras três soluções foram obtidas a partir desta por quantidades diferentes de  $AgNO_3$  (ver tabela 2.2). Depois da solução polimérica se encontrar homogeneizada é adicionado a massa de  $AgNO_3$  necessária à obtenção da proporção de PVP

para  $\text{AgNO}_3$  (PVP: $\text{AgNO}_3$ ) pretendida. Seguidamente, a mistura é agitada durante uma hora, no agitador magnético, protegida da luz (o frasco com a solução é revestido com papel de alumínio). A nomenclatura usada para referir estas soluções (S200:1, S100:1 e S50:1) coloca em evidência as proporções PVP: $\text{AgNO}_3$  correspondentes.

Tabela 2.2: Constituição das soluções poliméricas utilizadas.

Designação da solução	PVP(%)	etanol:água	PVP : $\text{AgNO}_3$
<b>S0</b>			—
<b>S200:1</b>	18	13	200:1
<b>S100:1</b>			100:1
<b>S50:1</b>			50:1

Os filmes e matrizes de nanofibras produzidos a partir das soluções, serão referidos por uma nomenclatura semelhante à das soluções onde se substitui o “S” por “F”, no caso de se tratar de um filme, e por “M”, no caso de se tratar de uma matriz.

### 2.1.2 Condutividade

A incorporação de um composto metálico nas soluções irá alterar significativamente a condutividade das mesmas. Como a condutividade das soluções é um parâmetro importante no processo de electrofiação, procedeu-se à medição da condutividade das soluções poliméricas (S0, S200:1, S100:1 e S50:1) utilizando o equipamento da marca *HANNA*, modelo *HI 4521*.

## 2.2 Produção de Filmes

Os filmes foram usados para fazer uma avaliação prévia da eficiência do processo de reticulação e do método de produção das nanopartículas de prata. Para a sua produção, as soluções poliméricas foram espalhadas para um acetato *STAEDTLER lumocolor Photocop film Kopierfolie (0,10 mm)* (210 x 297 mm, A4), deixando depois o solvente evaporar e deixou-se secar à temperatura ambiente e na ausência de luz.

## 2.3 Produção das matrizes de nanofibras

### 2.3.1 Electrofiação

A figura 2.1 mostra a montagem utilizada na electrofiação das soluções poliméricas para produção das matrizes de nanofibras.

Os principais elementos deste sistema de electrofiação são uma fonte de alta tensão (construída no GREAT) que permite aplicar tensões até 30 kV, uma bomba ejetora (*New Era Pump Systems, Inc*) e um colector metálico, plano, colocado na vertical e ligado à terra. Na bomba ejetora é colocada a seringa (utilizou-se uma seringa de 5 ml da *Braun* com um -

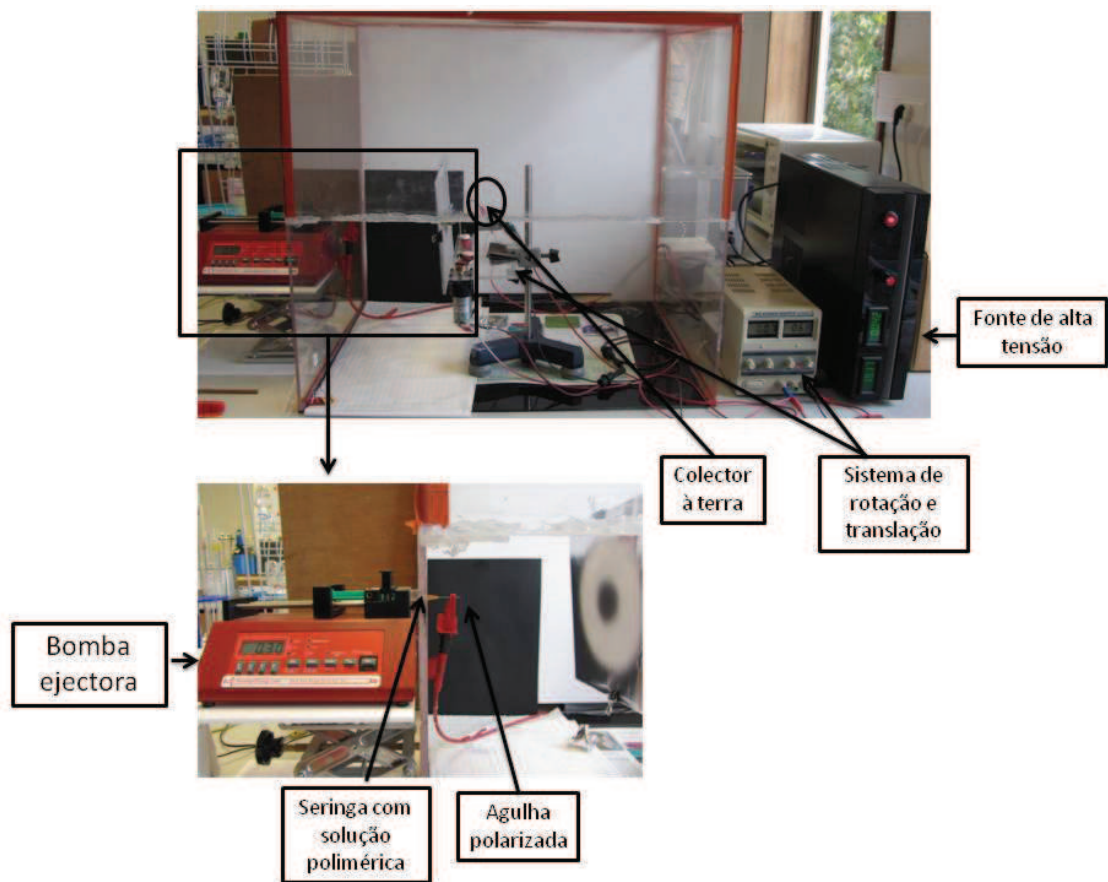


Figura 2.1: Montagem utilizada para o processo de electrofiação.

diâmetro interno de 12,74 mm). A seringa contém a solução polimérica que será fiada. Uma agulha é ajustada na ponta da seringa (calibre 23G, diâmetro interno 0,33 mm) e a ela liga-se um crocodilo fixo à ponta do cabo que estabelece a ligação à fonte de tensão. O colector é suportado por um sistema que permite estabelecer um movimento rotacional e translacional, o que permite obter deposições mais uniformes. Como se pode observar na figura 2.1, tanto o colector como a agulha estão no interior de uma caixa de acrílico que permite extrair para o exterior da sala os solventes que durante o processo de electrofição (este aspecto é particularmente importante quando são usados solventes tóxicos). Esta também permite ter algum controlo na temperatura e humidade aos quais decorre o processo. Os valores destes parâmetros são monitorizados por medidor de humidade e temperatura (*Rotronic, 8303 Basserdorf*) colocado no interior da caixa de acrílico.

### 2.3.2 Avaliação microscópica das fibras

Para avaliação das fibras recorreu-se à Microscopia Óptica e à Microscopia Electrónica de Varrimento (SEM, do inglês *Scanning Electron Microscopy*). A Microscopia Óptica permitiu realizar uma primeira avaliação da qualidade das fibras e aferir os parâmetros de produção e SEM permitiu medir o diâmetro das fibras.

Na técnica de microscopia electrónica de varrimento um feixe de electrões é focado, acelerado e direccionado, por um sistema de lentes condensadoras colocadas em vácuo, para uma amostra fina. Os electrões acelerados transportam uma alta energia que ao interagirem com a amostra dão origem a electrões e fotões que serão detectados pelo detector e o sinal é amplificado, e consequentemente, a imagem é formada. Dentro dos sinais emitidos pela amostra os mais importantes para a obtenção de imagem provêm dos electrões secundários e/ou dos electrões retroespehados. A resolução espacial está dependente da energia com que as partículas ou raios atingem o detector e sinal recolhido é utilizado para modular o brilho e contraste da imagem. Para a caracterização das matrizes de nanofibras, designadamente, da forma e tamanho das nanofibras utilizou-se o equipamento da marca *Hitachi*, modelo *S-2400*. As matrizes de nanofibras não são condutoras, logo é necessário a preparação prévia das amostras para que estas se tornem condutoras para a realização de SEM [Dedavid et al., 2007].

As amostras são colocadas sobre um suporte metálico e fixadas através de fita adesiva dupla face de carbono. Posteriormente, a preparação é revestida com uma camada fina de liga de ouro-paládio que melhora o contraste da imagem. As amostras ao serem condutoras permitem a interacção com o feixe de electrões e a emissão de electrões torna-se mais eficaz, facilitando a construção da imagem.

A avaliação do diâmetro das nanofibras foi realizada através da utilização do software de tratamento de imagem *ImageJ*. Inicialmente, com auxílio da ferramenta *Find Edges*, os bordos das nanofibras foram evidenciados e, posteriormente, foram medidos os diâmetros das fibras pela função *Analyze - Set Scale*.

## 2.4 Insolubilização do PVP em meios aquosos

Como referido anteriormente, as matrizes de nanofibras estudadas neste trabalho destinam-se a ser incorporadas num substituto de pele. Alguns tipos de feridas, como queimaduras graves altamente exsudativas, necessitam de curativos com uma elevada capacidade de absorção dos fluidos fisiológicos mantendo a sua estabilidade estrutural e dimensão da área coberta. Portanto é necessário tornar as matrizes de nanofibras de PVP insolúveis em água, para que quando em contacto com o local a serem aplicadas não se dissolvam.

### 2.4.1 Processo de reticulação

Com o intuito de tornar as matrizes de nanofibras de PVP insolúveis em água, estudou-se o processo de reticulação do PVP promovido por radiação UV. Como a produção das matrizes é morosa e carece de um ajuste prévio dos parâmetros de fiação, começou-se por utilizar neste estudo filmes de PVP com e sem  $\text{AgNO}_3$  incorporado neste estudo e posteriormente as matrizes. Estes materiais foram sujeitos a radiação UV com um comprimento de onda de 254 nm no interior de um equipamento (*UVP*, modelo *CL-1000*, *Ultra Violet Products, Ltd*) no qual 5 lâmpadas de 8W emitem radiação deste comprimento de onda com uma distribuição no plano horizontal aproximadamente uniforme. Os materiais foram sujeitos a diferentes tempos de irradiação.

### 2.4.2 Grau de inchamento e perda de massa

As determinações do grau de inchamento e da perda de massa em função do tempo de reticulação têm como objectivo estudar a influência do tempo de irradiação UV na reticulação do polímero (PVP).

- **Grau de inchamento**

O grau de inchamento é uma medida da capacidade de uma material absorver água. A capacidade de absorção de água de uma amostra de PVP depende das interações que se estabelecem entre o polímero e a água e estas dependem do grau de reticulação do polímero. Para os testes do grau de inchamento foram consideradas amostras dos seguintes materiais: F0, F100:1, M0 e M100:1. As amostras foram cortadas com as dimensões  $1,5 \times 1,5 \text{ cm}^2$  e  $2 \times 2 \text{ cm}^2$  no caso dos filmes e das matrizes, respectivamente. A massa inicial destas amostras secas ( $m_s$ ) foi determinada antes de proceder à sua hidratação. Para se proceder à hidratação das amostras, estas foram colocadas em água destilada durante uma hora à temperatura ambiente. Seguidamente, as amostras foram retiradas de água e o excesso de líquido à sua superfície foi removido com papel absorvente. As amostras irradiadas durante intervalos de tempo muito curtos dissolveram-se quando colocadas em água, são portanto solúveis em água e por isso não se lhes pode associar um grau de inchamento. As restantes amostras foram então

pesadas e a sua massa ( $m_h$ ) registada. O grau de inchamento ( $S$ , do inglês *swelling*) foi determinado através da expressão:

$$S = \frac{m_h - m_s}{m_s} \quad (2.1)$$

- **Perda de massa**

As amostras que, após a hidratação, apresentavam alguma estabilidade, foram depois secas tendo permanecido num excicador durante 12 horas (*overnight*). A sua massa seca ( $m_{s'}$ ) foi então determinada. A perda de massa ( $P_{massa}$ ) é dada pela diferença das massas da amostra seca antes e depois de hidratada, relativamente à massa inicial (amostra seca antes de hidratada):

$$P_{massa} = \frac{m_s - m_{s'}}{m_s} \quad (2.2)$$

A perda de massa irá dar indicação da capacidade de reticulação do polímero, já que quanto maior for a reticulação do polímero, menos pontos na cadeia polimérica estarão disponíveis para a interacção com a água e menor será a solubilização do polímero neste líquido.

## 2.5 Formação das nanopartículas de prata

A formação das nanopartículas de prata (NPs) nas nanofibras e nos filmes de PVP, produzidos a partir de soluções contendo nitrato de prata, é induzida pela sua irradiação com radiação UV que promove a redução e agregação da prata. Assim, a irradiação conduz não só à reticulação do PVP, como vimos atrás, como também à formação de nanopartículas de prata. Assim, também a formação de nanopartículas de prata foi avaliada em função do tempo de irradiação.

### 2.5.1 Análise microscópica das nanopartículas

Na técnica de microscopia electrónica de transmissão (TEM, do inglês *Transmission Electron Microscopy*) um feixe de electrões é focado e direccionado, por um sistema de lentes electromagnéticas colocadas em vácuo, para uma amostra ultra fina. Ao feixe de electrões está associado um comprimento de onda muito menor do que o da luz visível e, por isso, é possível obter imagens de grande resolução que permitem “observar” à escala do Angstrom. O feixe de electrões interage com a amostra enquanto a atravessa e alguns electrões são dispersos desaparecendo do feixe. A detecção dos electrões que atravessam a amostra (não dispersos) permite construir uma imagem da mesma. Aos vários níveis de intensidade da imagem correspondem zonas de interacção do feixe com matéria de diferentes densidades. Assim, neste estudo, foi possível distinguir zonas das fibras onde ocorreu interacção com NPs de zonas



onde só existia polímero. Para a caracterização das NPs, nomeadamente, para avaliar a sua forma e tamanho, recorreu-se ao equipamento da marca *Hitachi*, modelo *H-8100 II* (ver figura 2.2). Para a preparação das amostras, que não devem ter espessura superior a 250  $\mu\text{m}$  pois a amostra tem sempre que ser transparente ao feixe de electrões, foram utilizadas grelhas de cobre, com 3,05 mm de diâmetro interno e com uma malha interior de 38  $\mu\text{m}$  (ver figura 2.3). Para a obtenção de cada tipo de amostra (M200:1, M100:1 e M50:1), procedeu-se da seguinte forma: colocaram-se algumas grelhas sobre o colector, no sistema de electrofiação, e, nas condições habituais de produção das matrizes, procedeu-se à fiação da respectiva solução durante um curto período de tempo (5 minutos). Entre as malhas da grelha ficaram suspensas algumas fibras como as que se mostram na imagem de microscópio óptico da figura 2.4. Seguidamente, as fibras depositadas nas grelhas foram submetidas a radiação UV (de forma semelhante ao efectuado com as outras amostras), no sentido de formar as NPs. Para os diferentes tipos de amostras consideraram-se os tempos de irradiação apresentados na tabela 2.3.



Figura 2.2: *Microscópio de Transmissão Electrónica.*

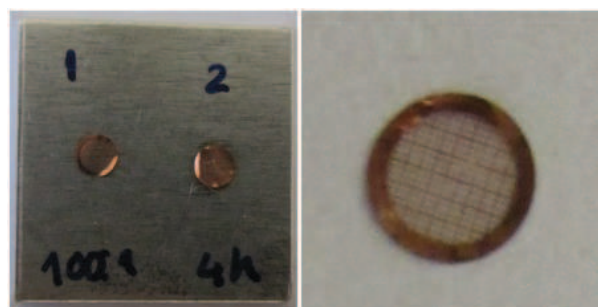


Figura 2.3: *Grelhas de cobre para suporte das amostras para TEM.*

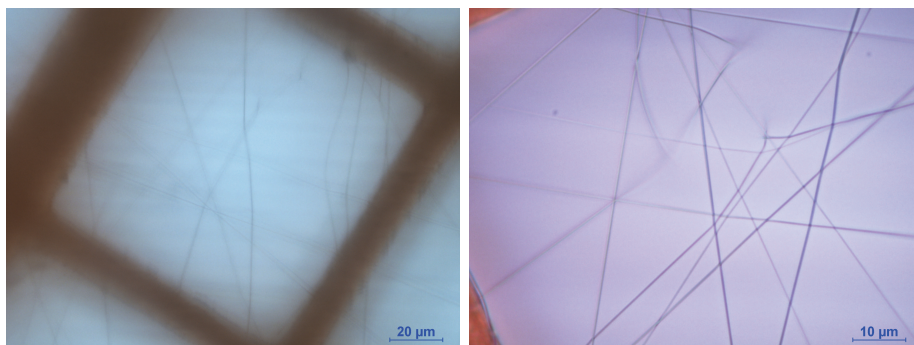


Figura 2.4: Imagens de microscópio óptico das grelhas com as nanofibras depositadas para observação em TEM.

Tabela 2.3: Tempos de irradiação UV das amostras para TEM.

Amostra Depositada	Tempo de Irradiação Uv (minutos)
M200:1	240
M100:1	30;60;120;240;360;480
M50:1	240

A avaliação do tamanho das NPs, à semelhança da realizada para os diâmetros das nanofibras, foi efectuada recorrendo ao software *ImageJ*. Para as medições utilizou-se a funcionalidade *Analyze - Set Scale*. Nesta função determinou-se a escala a utilizar e, seguidamente, mediu-se o tamanho das nanopartículas.

## 2.6 Espectrofotometria UV-visível

Num espectrofotómetro UV-visível, um feixe de luz que varre comprimentos de onda na gama UV e visível, atravessa uma amostra onde é parcialmente absorvido. A radiação não absorvida é detectada e permite construir espectros de absorvância<sup>1</sup>. Os picos de absorvância que surgem nos espectros obtidos permitem identificar níveis energéticos de determinados estados característicos do material analisado. Neste caso, foi possível identificar picos característicos de ligações químicas que ocorre durante a reticulação do polímero e de estados das nanopartículas de prata excitados pela radiação incidente (estados de ressonância plasmónica).

Através de espectrofotometria de UV-visível, foi possível monitorizar pelos espectros de absorvância a formação de nanopartículas de prata em filmes irradiados e a libertação de nanopartículas, presentes em filmes e em matrizes irradiados.

<sup>1</sup>gráficos que reflectem a quantidade de radiação absorvida em função do comprimento de onda

### 2.6.1 Detecção da formação das nanopartículas de prata

A detecção de NPs nos filmes F200:1, F100:1 e F50:1 foi efectuada para diferentes tempos de irradiação dos mesmos. O filme F0 foi também analisado para comparação. Cada filme foi preparado para o teste espalhando uma gota da respectiva solução sobre uma face de quartzo da célula para espectrofotometria de soluções (esta célula tem duas faces de quartzo, transparentes à radiação UV-vis, separadas por 1 cm e capacidade para 3,5 ml). O espalhamento foi efectuado com o auxílio de um rectângulo de uma folha de acetato, de forma a obter um filme fino, que foi deixado secar à temperatura ambiente e na ausência de luz.

O filme foi depois, sucessivamente, irradiado durante determinado tempo (ver tabela 2.4), no equipamento descrito em 2.5, ao fim do qual foi sujeito à análise espectrofotométrica. Os espectros foram realizados num equipamento da marca *SHIMADZU*, modelo *UV-2101PC* (ver figura 2.5). Na posição de referência do espectrofotómetro (branco) foi colocada uma célula igual à utilizada para depositar o filme mas sem filme depositado. Nos espectros obtidos surgem picos localizados em torno dos 400 nm correspondentes às NPs. Variações nas características destes picos, permitem obter informação sobre a quantidade e tamanhos das NPs formadas.

**Tabela 2.4:** *Tempos de irradiação UV dos filmes para realização da espectrofotometria de UV-Visível.*

Amostra	Tempo de Irradiação UV (minutos)
F0	0; 15; 30; 45; 60; 90; 120; 240; 360; 480
F200:1	0; 15; 30; 45; 60; 90; 120; 240; 360; 480
F100:1	0; 15; 30; 45; 60; 90; 120; 240; 360; 480
F50:1	0; 15; 30; 45; 60; 90; 120; 240; 360; 480

### 2.6.2 Libertação de NPs para água

Quando uma amostra polimérica contendo NPs é colocada em contacto com água, as NPs libertam-se da amostra e dispersam-se no dando origem a uma suspensão coloidal, cujo espectro de absorvância de UV-vis revela um pico no comprimento de onda (c.d.o) correspondente às NPs (~400 nm).

A monitorização da libertação de NPs para água foi efectuada considerando amostras do filme F100:1 e das M50:1, M100:1 e M200:1 irradiadas durante um determinado tempo (4 horas). A matriz M0 foi também analisada para comparação. As amostras foram colocadas numa célula para espectrofotometria de soluções (descrita no ponto anterior) em 3 ml de água destilada. Na posição de referência do espectrofotómetro (branco) utilizou-se uma célula apenas com água destilada.

Para impedir que as matrizes prejudicassem a medição por ficarem no caminho óptico do feixe de análise espectrofotométrica, foi utilizada uma rede em teflon. A rede suporta

as amostras na parte superior da célula, acima da zona de passagem do feixe de luz, não impedindo a dispersão das NPs para o meio (ver figura 2.5).

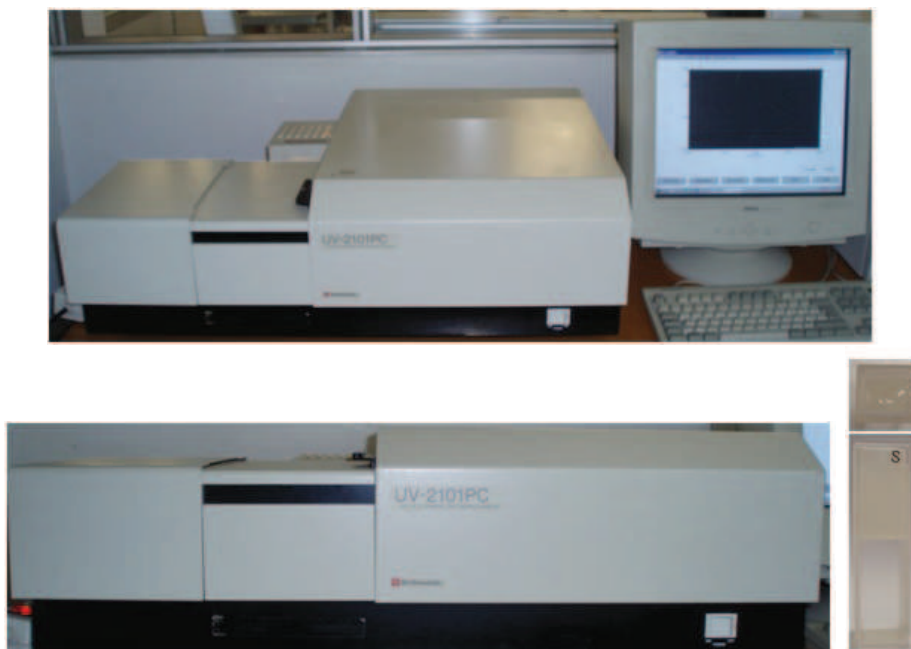


Figura 2.5: *Aparelho usado nos estudos de espectrofotometria e célula utilizada.*

A amostra do filme foi analisado ao fim de 24 horas em água. Quanto às matrizes de nanofibras, após a colocação da amostra na água foi iniciada a contagem do tempo e realizado um primeiro espectro. A este seguiram-se outros espectros a intervalos de 5 minutos, na primeira meia hora, de 15 minutos até aos 90 minutos e ainda aos 120, 240 e 360 minutos.

## 2.7 Testes Microbiológicos

Os microrganismos diferem na sua susceptibilidade aos diferentes antibióticos. Com o objectivo de avaliar o efeito biocida das matrizes de nanofibras com NPs incorporadas, recorreu-se a dois métodos: evolução quantitativa pelo método de determinação da concentração mínima inibitória (MIC, do inglês *Minimum Inhibitory Concentration*) e evolução qualitativa pelo método de Kirby-Bauer. Neste trabalho foram utilizadas as estirpes de microrganismos, pertencentes às colecções de culturas internacionais ATCC (*American Type Culture Collection*) e PYCC (*Portuguese Yeast Culture Collection*), indicadas na tabela 2.5.

Para a realização tanto dos ensaios em meio líquido (MIC) como em meio sólido (Kirby-Bauer) foi necessária a preparação de meios de cultura líquidos e sólidos.

Tabela 2.5: *Estirpes de microrganismos utilizadas no trabalho.*

Estirpe	Código
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25293
<i>Staphylococcus epidermis</i>	ATCC 14990
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 10145
<i>Escherichia coli</i>	ATCC DH3alfa
<i>Candida albicans</i>	PYCC 3436T

### 2.7.1 Preparação dos meios

O meio LB (do inglês, *Luria-Bertani broth*) é um meio rico utilizado para propagação e conservação de bactérias. O meio YM (do inglês, *Yeast extract-Malt*) é um meio rico utilizado para o crescimento de fungos. Para a produção dos meios sólidos foi adicionado Agar (2%), os quais são referidos, respectivamente, por LA (do inglês, *Luria-Bertani Agar*) e YMA (do inglês, *Yeast extract-Malt extract Agar*). Os diferentes meios diferem na sua composição como indicado nas tabelas 2.6 e 2.7. A proveniência dos materiais utilizados para os meios está apresentada na tabela 2.8.

No fim da mistura dos componentes (excluindo o Agar), adiciona-se água destilada até pré-fazer o volume pretendido. Após a mistura, os meios são autoclavados durante 20 minutos a 120°C a 1 atm. Para a preparação das placas de Agar, os meios LA e YMA depois de autoclavados foram arrefecidos até uma temperatura inferior (cerca de 55°C) e vertidos para as placas de Petri, solidificando à temperatura ambiente. As placas, após terem sido preparadas, foram incubadas a 37°C durante a noite para verificar ausência de contaminação e/ou conservadas a 4°C para evitar excessiva desidratação dos meios.

Tabela 2.6: *Constituição percentual dos meios de cultura líquidos LB e LA.*

Constituintes dos meios	LB (%)	LA (%)
<b>Extracto de Levedura</b>	1	1
<b>Tryptona</b>	0,5	0,5
<b>NaCl</b>	0,5	0,5
<b>Agar</b>	–	2

### 2.7.2 Preparação das culturas de microrganismos

As estirpes utilizadas neste trabalho encontravam-se conservadas como culturas puras a -80°C, em meio BHI (do inglês, *Brain Heart Infusion*), com 15% glicerol (v/v), e, por isso, foi necessário descongelar e transferir o inóculo da cultura, primeiro para o meio sólido e depois para o meio líquido, com uma ansa de repicagem. No caso de meio sólido, um inóculo (10 µl) de cultura pura foi retirado e colocado sobre o meio sólido LA ou YA em placa de

Tabela 2.7: Constituição percentual dos meios de cultura líquidos YM e YMA.

Constituintes dos meios	YM (%)	YMA (%)
Extracto de Levedura	5	5
Extracto de Malte	0,3	0,3
Peptona	0,5	0,5
Glucose	1	1
Agar	–	2

Tabela 2.8: Origem dos constituintes dos meios de cultura.

Constituintes dos meios	Marca	Referência	Origem
Extracto de Levedura	Quilaban	212750	Portugal
Extracto de Malte	Quilaban	218630	Portugal
Peptona	Quilaban	211677	Portugal
NaCl	Pronalab	2428	Portugal
Tryptona	Quilaban	211705	Portugal
Glucose	Vaz Pereira	10888	Portugal
Agar	IberAgar	—	Portugal

Petri. Com o auxílio da ansa de repicagem, o inóculo foi espalhado de forma a obterem-se colónias isoladas. No final, a placa foi incubada na estufa (*WTC binber*) a 37°C durante a noite (18h-24 horas para culturas bacterianas e 48 horas para culturas de fungos).

Para a obtenção de uma cultura bacteriana em meio líquido (neste caso utiliza-se meio LB), foi retirado um inóculo de colónias isoladas em meio sólido, com auxílio da ansa de repicagem, e colocado em meio LB (cerca de 5 ml). Um tubo com meio LB sem células (para efectuar o controlo de esterilidade do meio) e o tubo com meio LB com células foram incubados em agitação orbital (agitador *Sanyo*, modelo *Corbi-Sabe TS netwise*) a 37°C a 120 rpm, durante a noite (18h-24h).

### 2.7.3 Determinação da concentração celular em meio líquido

A concentração de células em cultura num líquido expressa-se em CFU/ml :

$$\frac{\text{CFU}}{\text{ml}} = N \times \frac{1}{I} \times D \quad (2.3)$$

Na expressão anterior,  $N$  é o número de colónias formadas numa sementeira (em Agar) e  $I$  é o volume (expresso em ml) de inóculo de cultura semeada e obtida de uma diluição  $D$  da cultura cuja concentração se pretende quantificar. A sigla CFU (do inglês, *Colony-forming unit*) é usada para representar o número de unidades formadoras de colónias. Quando se procede ao crescimento de uma cultura em meio líquido, a avaliação da sua concentração exige em geral que sejam efectuadas várias diluições sucessivas (ver figura 2.6) por forma



a que um dos correspondentes inóculos permita obter uma sementeira com um número de colónias formado contável.

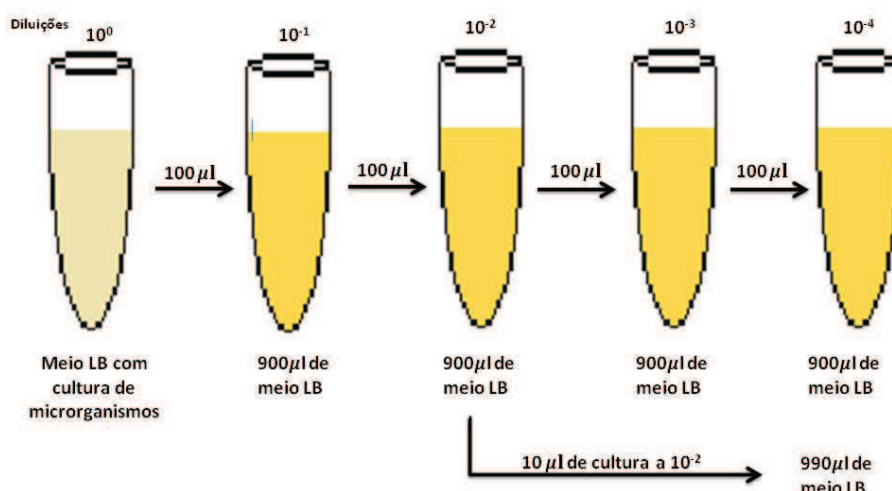


Figura 2.6: Esquematisação das diluições efectuadas a partir da cultura não diluída ( $D = 10^0$ ) (deste trabalho).

Neste trabalho foi utilizada uma grelha numerada para semear os inóculos para, posteriormente, se prosseguir com a contagem das colónias. Em cada posição da grelha foi colocada uma gota de 20  $\mu$ l ( $I = 2 \times 10^{-5}$  l) de cada diluição. As diluições efectuadas foram de diversas ordens, começando na ordem zero ( $D = 0$ ), seguida de uma diluição de 1/10 ( $D = 1 \times 10^{-1}$ ) até 1/1000000 ( $D = 1 \times 10^{-6}$ ), para ser possível obter um número de colónias contáveis. De notar que é necessário intervalar os números das grelhas onde os inóculos serão colocados de forma a não haver interferência na contagem das colónias formadas. As gotas são deixadas absorver e a placa de Agar é colocada na estufa a 37°C durante a noite (18h-24h para uma cultura de bactérias). A contagem das colónias formadas foi efectuada visualmente. Quando é possível definir os bordos de cada colónia e a contagem se encontra entre 30 a 300 unidades, então diz-se contável. Se o número de colónias formadas for impossível de contar, então classifica-se por incontável. Por último, considera-se confluyente quando os bordos das colónias não estão definidos.

#### 2.7.4 Concentração mínima inibitória (MIC)

A concentração mínima inibitória é a menor concentração de agente biocida capaz de inibir o crescimento visível de um microrganismo. Neste trabalho procedeu-se de forma a determinar o MIC da matriz com NPs M100:1, relativamente à estirpe *S. aureus*. Para tal

partiu-se de uma cultura com uma concentração celular de  $10^7$  CFU/ml. Segundo a curva de crescimento da figura 2.7, para uma concentração de  $10^7$  CFU/ml a densidade óptica a 600 nm ( $DO_{600}$ ) deverá estar presente no intervalo de absorvâncias entre [0,02; 0,04]. A curva de crescimento permite determinar o volume ( $V_i$ ), a retirar de uma cultura mãe com uma  $DO_{600}$  ( $D_i$ ), para obter um determinado volume final ( $V_f$ ) de uma cultura com uma concentração celular à qual corresponde a  $DO_{600}(D_f)$ :

$$D_i \times V_i = D_f \times V_f \quad (2.4)$$

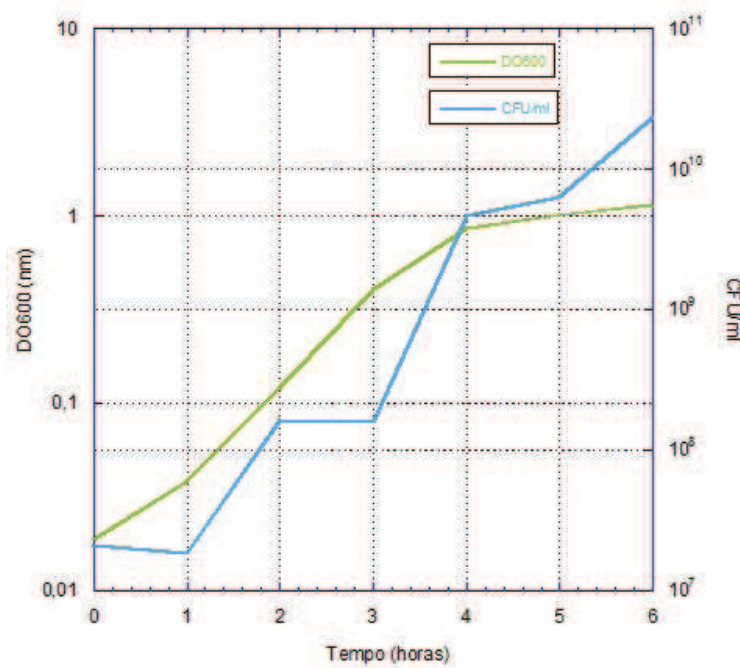


Figura 2.7: Curvas de crescimento para a estirpe *S.aureus*; adaptado de Fernandes, A [Fernandes, 2011]).

Depois de efectuar o crescimento da cultura celular, retirou-se uma amostra de 1ml e realizou-se a leitura da  $DO_{600}$ , em espectrômetro (Amersham Biosciences, modelo *Ultraspec 3100 PRO*). Seguidamente, foram realizadas as diluições necessárias para obter a concentração de  $10^7$  CFU/ml, isto é, uma cultura ( $Cul_{Final}$ ) com uma  $DO_{600}$  dentro do intervalo atrás referido. Esta foi utilizada para a preparação da cultura bacteriana a utilizar para a determinação da MIC.

Da  $Cul_{Final}$  retiraram-se 100  $\mu$ l aos quais se juntou 100 ml de meio LB. Esta solução, com  $10^4$  CFU/ml, foi repartida em porções volumes de 10 ml por tubos de 50 ml, para que posteriormente fossem adicionadas as amostras de matrizes de nanofibras com NPs incorporadas. Estas amostras foram previamente cortadas e pesadas. Seguidamente, foram expostas a radiação UV durante 4 horas. Ao mesmo tempo que ocorre a reticulação e formação de



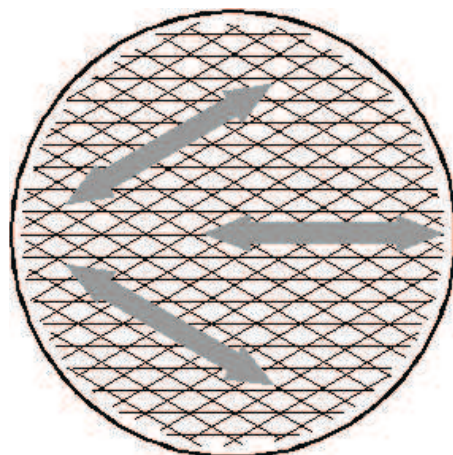
NPs, também as matrizes ficam esterilizadas, o que é essencial para a realização dos testes microbiológicos. Após irradiadas as matrizes foram colocadas em caixas de Petri esterilizadas para que não houvesse contaminação até à realização dos testes. As amostras com diferentes massas foram, então, colocadas nos diferentes tubos com a cultura bacteriana e colocados no agitador orbital a incubar a 37°C durante 18h-24h. Foram incluídos controlos apropriados para verificar a esterilidade dos meios e soluções: meio LB (controlo do meio), meio da cultura bacteriana (controlo do crescimento das células), e meio LB com matriz de nanofibras apenas de PVP (controlo do método de esterilização das matrizes).

### 2.7.5 Testes de Kirby-Bauer

O teste de Kirby-Bauer (KB) ou método por difusão em Agar [Black, 2008] permite avaliar a sensibilidade ou susceptibilidade das células a cada antibiótico ao ser inibida a propagação de células bacterianas em cultura. Para a realização do teste de Kirby-Bauer inicialmente foi necessário obter culturas em meio líquido de cada estirpe (ver tabela com estirpes 2.5). Neste sentido retiram-se um conjunto de colónias isoladas de cada estirpe e ressuspendeu-se em meio de cultura LB e LA, no caso de bactérias ou fungos, respectivamente. As culturas foram incubadas durante a noite a 37°C (no caso das bactérias o tempo e incubação é de 18h-24h e para os fungos de 48h). De seguida retirou-se uma alíquota de cada cultura e adicionou-se um micro gota a meio de cultura LB, de modo a obter uma suspensão celular com uma densidade padronizada, utilizando para o efeito uma escala MacFarland 0,5 (da marca *BioMerieux*). Através do método de Macfarland 0,5 cada suspensão celular obtida possuía uma concentração celular aproximadamente de  $10^8$  CFU/ml. As suspensões celulares obtidas foram utilizadas para semear as placas de Agar através de uma zaragatoa. Uma zaragatoa estéril foi mergulhada na cultura e pressionando a zaragatoa contra o interior da parede do tubo acima do nível do fluido retirou-se o excesso de cultura. Seguidamente espalhou-se a cultura sobre a superfície da placa de Agar rodando a placa para garantir uma distribuição uniforme do inóculo de cultura celular, para que no final se obtenha uma cultura homogénea e confluenta (ver figura 2.8).

Antes de colocar os discos de matrizes de nanofibras a placa é deixada secar à temperatura ambiente durante cerca de 5 minutos. Uma vez a superfície da placa seca colocam-se sobre o meio de cultura sólido os discos, de forma a que nem os discos nem os halos de inibição do crescimento celular entrem em contacto entre eles. Neste caso o agente biocida a ser testado são as NPs. A placa é colocada a incubar na estufa a 37°C, durante a noite (18h-24h ou 48h). As placas para cada estirpe foram produzidas em duplicado, de modo a assegurar a replicabilidade dos resultados. Durante a incubação o agente antimicrobiano difunde-se para fora do disco em todas as direcções. As áreas que não se encontram confluentes chamam-se as zonas ou halos de inibição. A zona de inibição (área do disco + área de inibição) é medida com auxílio de uma régua e as unidades são em mm (ver figura 2.9).

Mesmo quando a inibição existe no teste de difusão em Agar o agente biocida pode inibir,



**Figura 2.8:** *Modo de aplicação do inóculo com auxílio de uma zaragatoa sobre a placa de Agar. Para que a cultura celular no final obtida seja homogênea e confluyente é necessário que a zaragatoa aborde todos os pontos do Agar, passando pelo mesmo ponto pelo menos três vezes.*



**Figura 2.9:** *Representação da área de inibição para um disco de matriz de nanofibras. As NPs ao serem libertadas difundem-se pelo Agar de uma forma radial à volta de cada amostra provocando a inibição do crescimento celular (deste trabalho).*

mas não matar o microrganismo. Para avaliar se o agente é bacteriostático ou bactericida retiraram-se amostras da área de inibição e estas foram inoculadas tanto em meio de cultura, líquido como em placa de Agar e incubadas a 37°C durante a noite (18h-24h ou 48h), no caso do inóculo em meio líquido a incubação é realizada com agitação como referido anteriormente. Usualmente para a realização do teste de Kirby-Bauer utilizam-se discos previamente embebidos com uma solução com o agente antimicrobiano a testar. Porém, neste caso, o agente biocida a testar, as NPs, é produzido nas matrizes de nanofibras, logo serão utilizados discos das próprias matrizes de nanofibras. Os discos de matrizes de nanofibras a testar, M0, M200:1, M100:1 e M50:1, foram recortados com 10 mm de diâmetro e pesadas. A matriz de PVP serviu como controlo de esterilidade do processo. Os diferentes discos foram submetidos

a radiação UV para a reticulação do PVP, formação de NPs e esterilização. Após serem irradiados os discos foram guardados em meio anti-séptico (caixas de Petri estéreis) até à sua posterior utilização. Os testes microbiológicos foram efectuados em condições de assepsia, à chama, em bancadas estéreis (utilizando etanol a 70%) e material devidamente esterilizado, para assegurar que a zona de trabalho de encontrava estéril para prevenir contaminações.

### 2.7.6 Avaliação do efeito biocida provocado pelas nanopartículas de Prata

Os efeitos bactericidas podem ser avaliados colocando um inóculo (cerca de 5 µl) das soluções não turvas em novo meio de cultura (5 ml) e incubar a 37°C (18h-24h para culturas bacterianas e 48h para culturas de fungos). Os antimicrobianos, como é o caso das NPs, podem ter um efeito de inibir (bacteriostático) ou matar (bacteriolítico) as bactérias ou fungos. Com objectivo de averiguar qual o efeito das NPs sobre as bactérias, retirou-se uma alíquota de 15 µl das culturas bacterianas que não cresceram (meio translúcido) em contacto com as matrizes e colocou-se em 15 ml de novo meio de cultura. As novas culturas foram incubadas entre 18h-24h a 37°C.

## 2.8 Testes de citotoxicidade

Apesar das suas propriedades antissépticas as NPs têm tido uma utilização limitada na área da saúde devido à sua toxicidade. Uma vez que este estudo visa a incorporação de NPs em matrizes de nanofibras a serem utilizadas como cobertura de queimaduras e/ou feridas crónicas, é importante estudar os seus efeitos citotóxicos em células animais.

Com o objectivo de determinar a viabilidade celular na presença das matrizes de nanofibras com NPs incorporadas, realizaram-se culturas celulares e efectuaram-se testes de citotoxicidade por contacto directo e testes de adesão celular às matrizes.

Nos testes de citotoxicidade colocaram-se matrizes em contacto directo com o meio em poços no fundo dos quais foram semeadas as células. Para os testes de adesão semearam-se as células sobre matrizes de nanofibras. Para estudar a influência das diferentes proporções de AgNO<sub>3</sub> nas matrizes de nanofibras (M0, M200:1, M100:1 e M50:1) consideraram-se matrizes irradiadas 4 horas. A influência do tempo de irradiação UV foi avaliada para a matriz M100:1 irradiada durante 4h, 6h e 8 horas.

Nas culturas foi utilizada uma linha celular de células epiteliais do rim (HEK ,do inglês *Human Epithelial Kidney*) semeadas com uma concentração de  $1 \times 10^5$  células/ml. Inicialmente, descongelou-se uma alíquota da linha celular HEK e colocou-se em meio de cultura DMEM suplementado com soro fetal bovino (20%), antibióticos (penicilina e streptomomicina, 1%) e antifúngicos (fungizona, 0,5%). Os protocolos seguidos para a preparação das culturas celulares e, posteriormente, para os testes de citotoxicidade e adesão celular encontram-se em anexo (ver anexo A).

Na realização de todos os procedimentos garantiu-se que estes decorressem em condições de esterilidade utilizando uma câmara de fluxo laminar (marca *Polaris*, modelo *Steril*) e material estéril (esterilização por vapor ou autoclavagem). Em ambos os testes foram efectuados ensaios triplicados das amostras para assegurar a reprodutibilidade dos resultados.

Para os testes de citotoxicidade e de adesão celular, as matrizes de nanofibras a testar foram cortadas, para obter amostras circulares com diâmetro de 10 e 12 mm, respectivamente. Ambos os testes foram efectuados em placas de 24 poços com tratamento para aderência de células (ver figura 2.10). Para os testes de adesão celular fixaram-se as amostras às lamelas de vidro (diâmetro 12 mm), utilizando uma fina camada de solução de PVP. As amostras foram esterilizadas por irradiação UV, em simultâneo com o processo de formação das NPs nas matrizes de nanofibras.

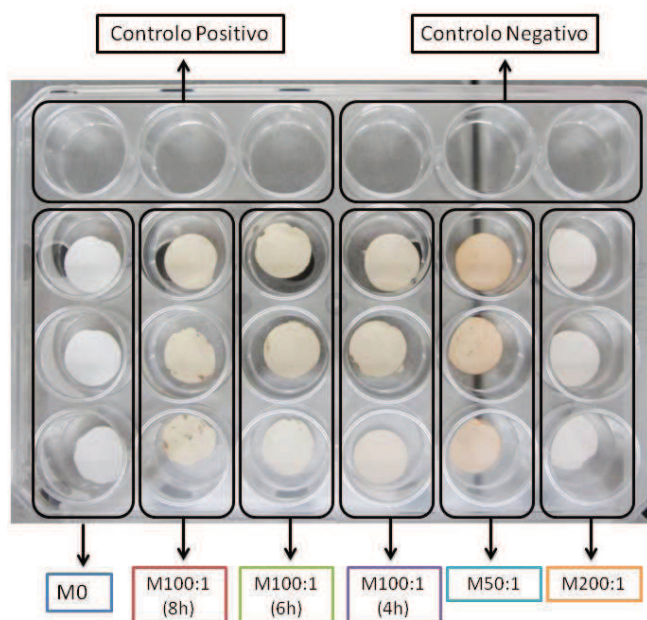


Figura 2.10: Preparação da placa de poços com as respectivas amostras para a realização dos testes de citotoxicidade.

Para a realização dos testes de citotoxicidade por contacto directo e testes de adesão celular utilizou-se o reagente PrestoBlue™. Este reagente é uma solução à base de resazurina (7-hidroxi-3H-fenoxazina-3-ona-10-óxido). As células vivas reduzem este composto para resazurina (ver figura 2.11), processo que é acompanhado pela alteração da cor e da fluorescência da solução. Por isso, medidas de fluorescência e de absorvância da solução dão uma indicação da actividade metabólica celular e, conseqüentemente, da presença de células viáveis. Devido à redução do composto pelas células viáveis, a coloração da solução passa de azul para um tom avermelhado e adquire fluorescência.

Alterações de viabilidade e proliferação celulares relativamente a um controlo podem ser

avaliadas pelas correspondentes alterações das medidas de fluorescência ou de absorvância. As medições de fluorescência são mais sensíveis e foram as utilizadas neste trabalho. Esta análise foi realizada no espectrofotômetro para leitura de placas de 24 poços, da marca *Biotek*, modelo *Synergy<sup>TM</sup>2*. A quantificação é realizada pela medição da fluorescência com os filtros 530 nm (excitação) e 590 nm (emissão). Os valores de fluorescência são proporcionais ao número de células viáveis presentes no meio.

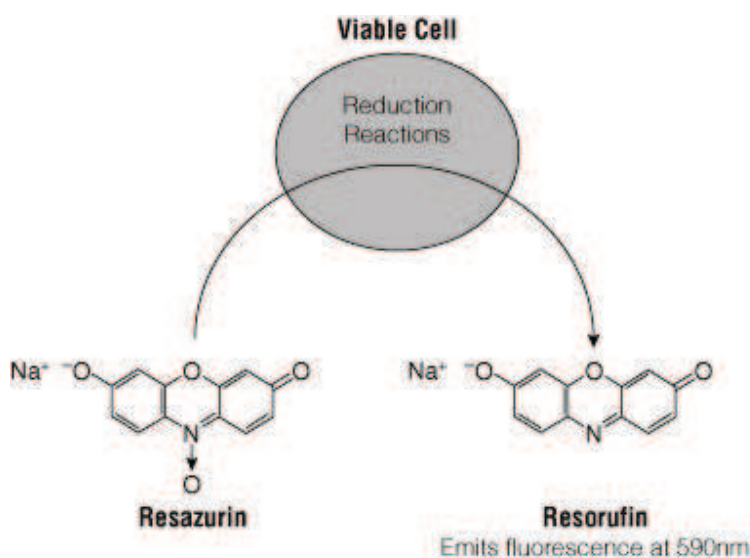


Figura 2.11: Redução do composto resazurina para resafurina para testar a viabilidade celular.

Nos testes de citotoxicidade foram feitos controlos positivos e negativos. Para tal consideraram-se sementeiras realizadas no fundo de poços onde não foram introduzidas matrizes de nanofibras. O controlo positivo serviu como referência para a ausência de viabilidade celular (indicação de citotoxicidade) e foi preparado semeando as células num meio com etanol (ver protocolo em anexo). O controlo negativo serviu como referência da viabilidade e proliferação celular e foi preparado semeando as células no fundo dos poços como habitualmente.



## Capítulo 3

# Resultados e Discussão

### 3.1 Soluções Poliméricas e nanofibras obtidas por electrofiação

Como foi referido anteriormente (secção 1.4), para se produzirem por electrofiação nanofibras com boas características é necessário conjugar diferentes parâmetros como a constituição do solvente utilizado, a concentração do polímero, o caudal, a tensão aplicada à agulha e a distância da agulha ao prato colector. Deste modo, procedeu-se ao ajuste dos parâmetros para proceder à electrofiação das diferentes soluções poliméricas (S0,S200:1,S100:1 e S50:1). Deste ajuste resultaram os parâmetros indicados na tabela 3.1. Com estes conjuntos de parâmetros o processo ocorre sem problemas: sem acumulação de gota na ponta da agulha e sem formação de jactos múltiplos ou mesmo a quebra do jacto. Enquanto se procedia ao ajuste dos parâmetros foi-se monitorizando as fibras por microscopia óptica (ver figura 3.1).

Tabela 3.1: *Parâmetros utilizados na electrofiação das soluções poliméricas S0,S200:1,S100:1 e S50:1.*

Soluções Poliméricas	Voltagem (V)	Distância (cm)	Caudal (ml/h)
S0	14	15	0,5
S200:1	16	15	0,3
S100:1	18	15	0,2
S50:1	18	12	0,1

Em relação aos parâmetros ambientais, as deposições de nanofibras ocorreram sob uma temperatura que oscilava entre 22°C e 24°C e uma humidade relativa que variava de 46% a 48%. Com o aumento da proporção de AgNO<sub>3</sub> nas das soluções poliméricas foi perceptível um aumento da viscosidade das mesmas. Quanto à condutividade procedeu-se à sua medição e obtiveram-se os resultados apresentados na tabela 3.2. Verifica-se na figura 3.2 que a condutividade aumenta de uma forma aproximadamente linear com o aumento da proporção de AgNO<sub>3</sub> para PVP nas soluções.



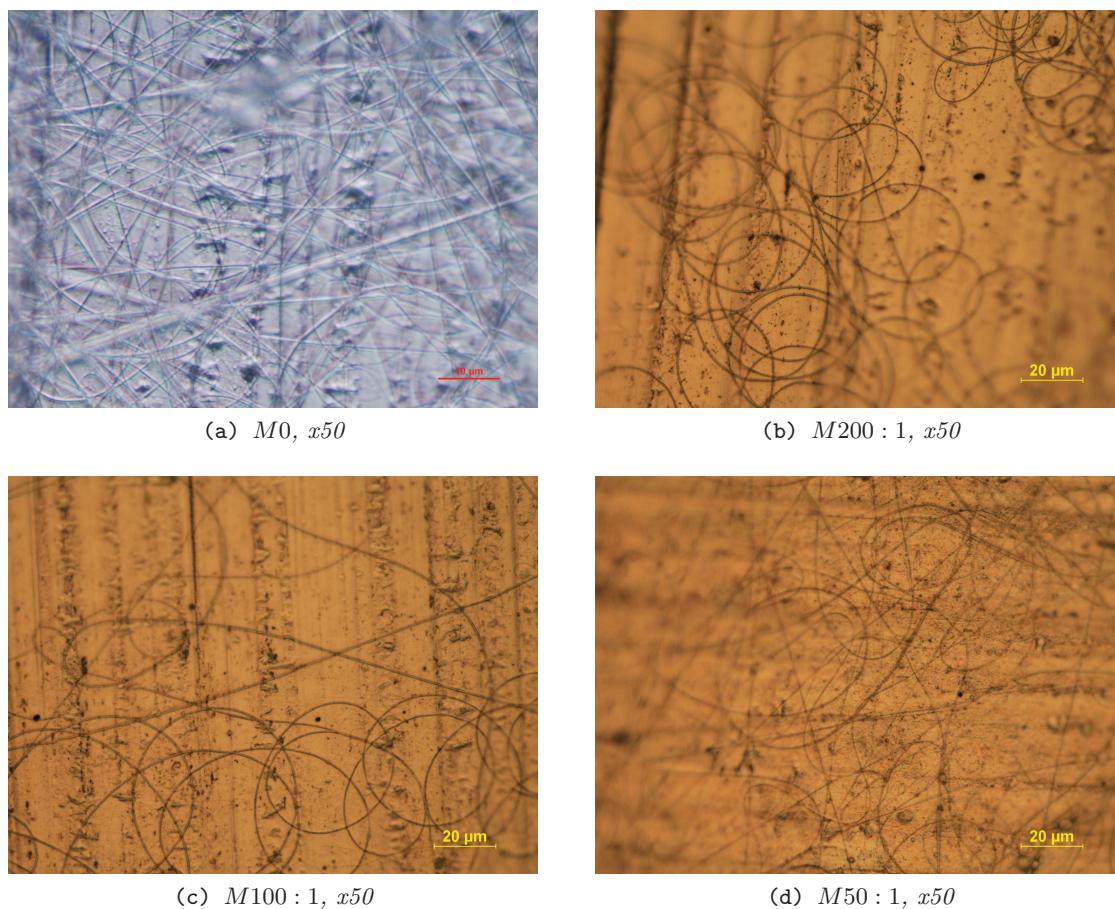


Figura 3.1: Imagens de Microscopia Óptica das matrizes de nanofibras  $M0$ ,  $M200:1$ ,  $M100:1$  e  $M50:1$ .

Tabela 3.2: Condutividade das soluções poliméricas  $S0$ ,  $S200:1$ ,  $S100:1$  e  $S50:1$  ( $T=23^{\circ}\text{C}$  e condutividade da água  $=2,836\mu\text{S}/\text{cm}$ ).

Soluções Poliméricas	Condutividade ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ )
<b>S0</b>	$10,98 \pm 0$
<b>S200:1</b>	$181,4 \pm 1,8$
<b>S100:1</b>	$392,3 \pm 0,9$
<b>S50:1</b>	$607,1 \pm 0,9$

O aumento da condutividade da solução tornou o processo de electrofiação mais instável mesmo depois de ajustados os parâmetros para os valores da tabela 3.1. O aumento da concentração do sal ( $\text{AgNO}_3$ ) na solução fiada aumenta a densidade de carga transportada pela solução como indica o aumento da sua condutividade. Como se pode constatar pelas imagens de Microscopia Electrónica de Varrimento (SEM) da figura 3.3 o aumento da condutividade da solução dá origem a fibras mais finas devido ao aumento da repulsão electrostática no



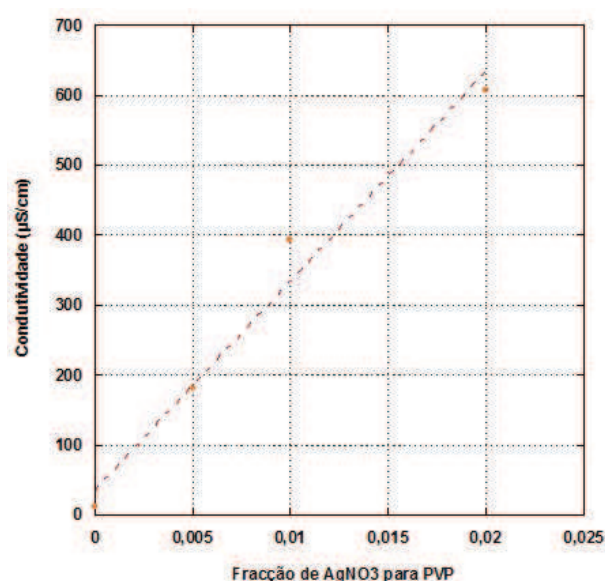


Figura 3.2: Representação gráfica da condutividade em função da fracção de  $\text{AgNO}_3$  para PVP.

jacto que transporta mais carga.

Como foi referido anteriormente o processo de electrofiação da solução S50:1 foi sempre um tanto instável. Este facto é explicado pela elevada condutividade desta solução. Por este facto, as fibras obtidas a partir S50:1 (M50:1) são mais finas (ver tabela 3.3) e existem mesmo fibras muito finas (com origem em jactos secundários que se separam do principal devido à grande repulsão) que se apresentam partidas pois quebraram devido ao grande alongamento.

Tabela 3.3: Diâmetros das nanofibras nas matrizes M0, M200:2, M100:1 e M50:1 com o respectivos desvios padrão.

Matrizes	Diâmetros (nm)
M0	754,4±86,6
M200:1	264,4±54,1
M100:1	185±2 49,1 e 80±23,9
M50:1	215,7±2 47,7 e 71,93±29,5

Perante os histogramas apresentados na figura 3.3 obtidos pela medição dos diâmetros das fibras de cada matriz é possível observar que para as soluções de maior condutividade são originadas fibras com uma distribuição de diâmetros bimodal, ou seja, existem dois máximos no histograma. Na tabela 3.3 estão representadas as médias dos diâmetros das fibras, sendo que para as matrizes de nanofibras M100:1 e M50:1 apresenta-se a média dos diâmetros das fibras dos dois máximos existentes.

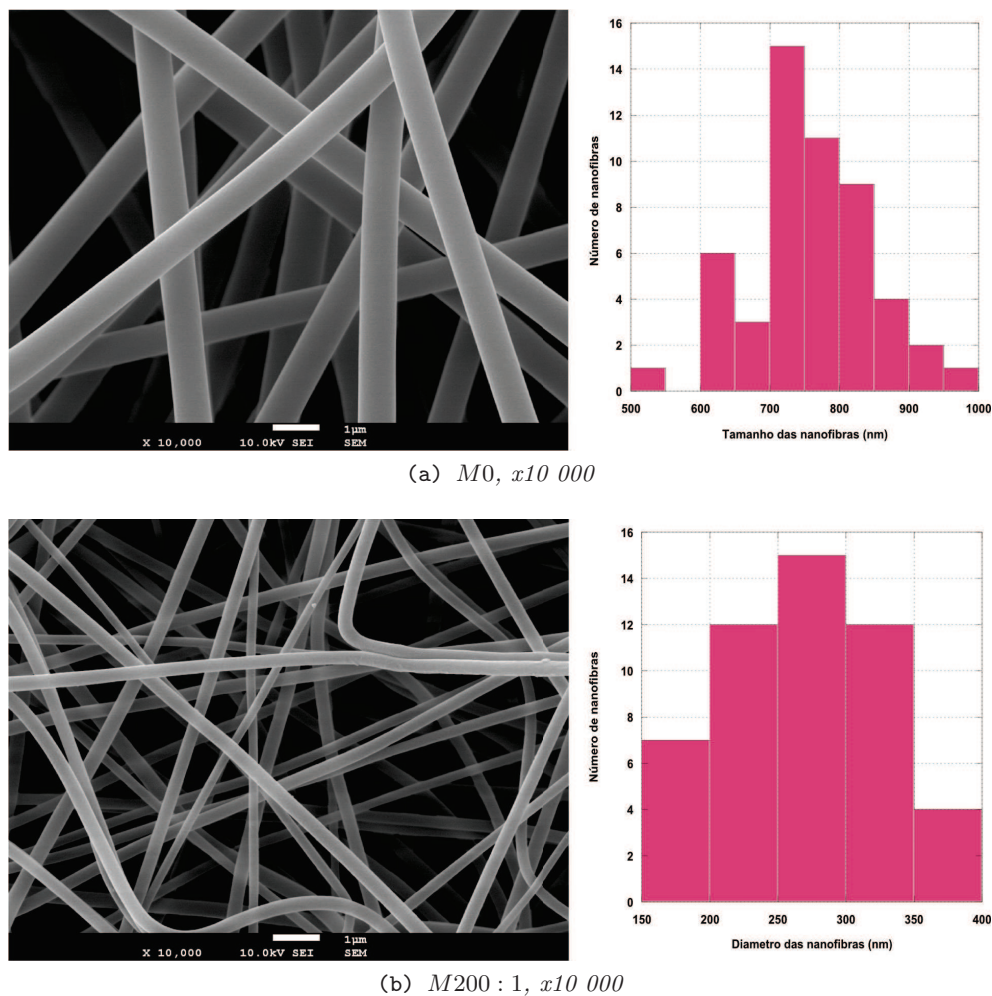
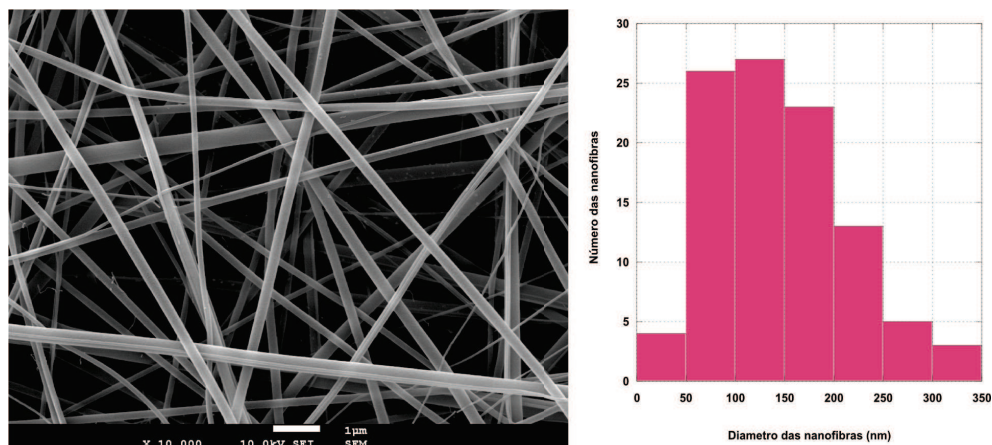
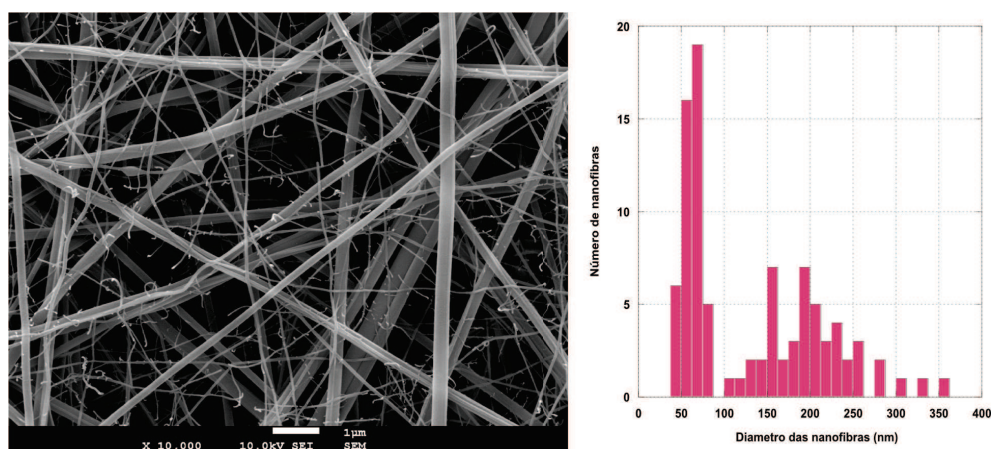


Figura 3.3: *Imagens de Microscopia electrónica de varrimento das matrizes de nanofibras (a)  $M0$ , (b)  $M200:2$ , (c)  $M100:1$  e (d)  $M50:1$ .*

### 3.1. SOLUÇÕES POLIMÉRICAS E NANOFIBRAS OBTIDAS POR ELECTROFIAÇÃO



(c) M100 : 1,  $\times 10\ 000$



(d) M50 : 1,  $\times 10\ 000$

Figura 3.3: *Imagens de Microscopia electrónica de varrimento das matrizes de nanofibras (a) M0, (b) M200:2, (c) M100:1 e (d) M50:1.*

## 3.2 Estabilidade das amostras de PVP irradiadas em água

Para avaliar a reticulação do polímero, por acção da radiação UV, realizaram-se testes de grau de inchamento e perda de massa. Para estes testes foram utilizadas amostras inicialmente de filmes e, posteriormente, de matrizes obtidas a partir das soluções S0 e S100:1. Cada tipo de amostra foi sujeito a diferentes tempos de exposição a radiação UV: 15, 30, 60, 90, 120, 240, 360 e 480 minutos.

Depois de irradiadas as amostras foram colocadas em água destilada durante uma hora. Pode constatar-se de imediato um comportamento diferente para os filmes e para as matrizes: quando imersos em água a área dos quadrados dos filmes aumenta significativamente enquanto a área das matrizes diminui ligeiramente. Assim as matrizes incham em contacto com a água espessando.

Inicialmente as amostras foram difíceis de manipular devido à baixa reticulação, mas com o aumento do tempo de irradiação UV a sua manipulação tornou-se mais fácil. As amostras que se dissolveram quando colocadas em água destilada foram consideradas solúveis em água devido à sua baixa reticulação.

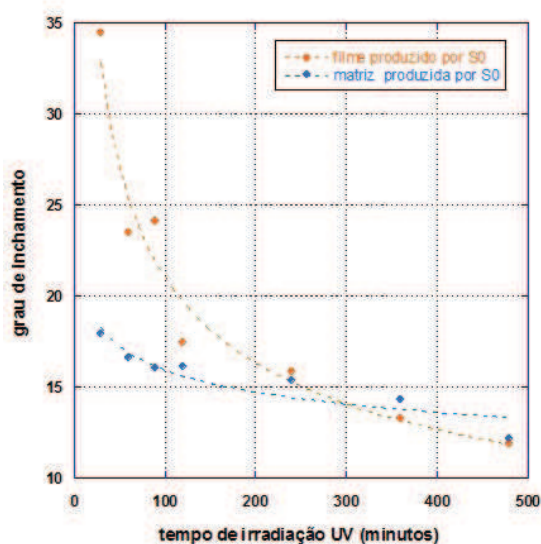
### 3.2.1 Grau de inchamento e perda de massa

Para o cálculo do grau de inchamento e da perda de massa foram utilizadas as equações 2.1 e 2.2, respectivamente, apresentadas na secção 2.4. A partir dos valores obtidos foram construídos os gráficos do grau de inchamento e perda de massa em função do tempo de irradiação UV que se apresentam na figura 3.4.

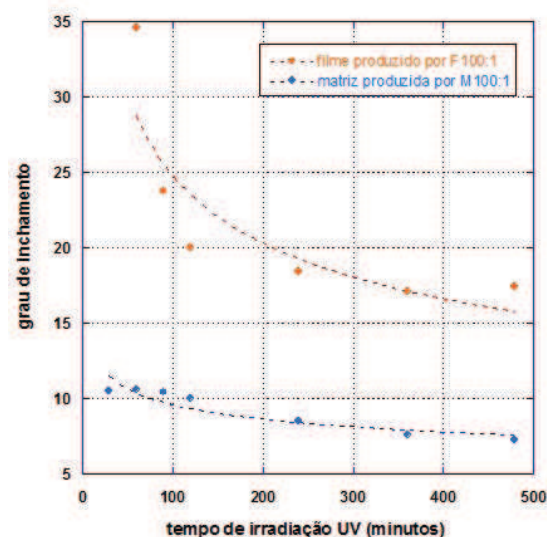
Pela observação dos gráficos da figura 3.4 pode concluir-se que, em geral:

- os valores do grau de inchamento e da perda de massa começam por diminuir com o tempo de irradiação e tendem a estabilizar para os tempos de irradiação mais elevados;
- o grau de inchamento dos filmes é superior ao das matrizes;
- a perda de massa das matrizes é superior à dos filmes e tende para os 15%;
- a partir dos 240 min (4h) a diminuição da perda de massa das matrizes não é significativa e situa-se entre os 15-25% sendo superior na presença de prata (M100:1).

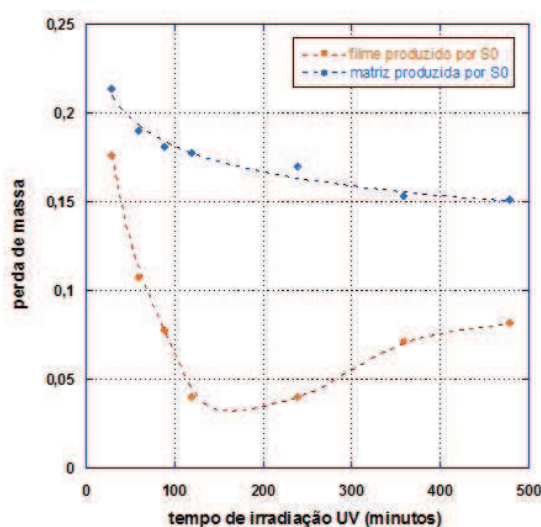
Com o aumento do tempo de exposição do polímero à radiação UV o número de ligações entre cadeias aumenta o que conduz à formação de redes tridimensionais de rigidez crescente com o tempo de irradiação. À medida que a rigidez da estrutura aumenta a sua capacidade de expandir para permitir a absorção de água diminui e, com ela, o grau de inchamento e perda de massa. A grande porosidade das matrizes leva a que a superfície de contacto com a água seja bastante maior nestas do que nos filmes. A maior superfície de contacto com a água é responsável pelos valores mais elevados de perda de massa.



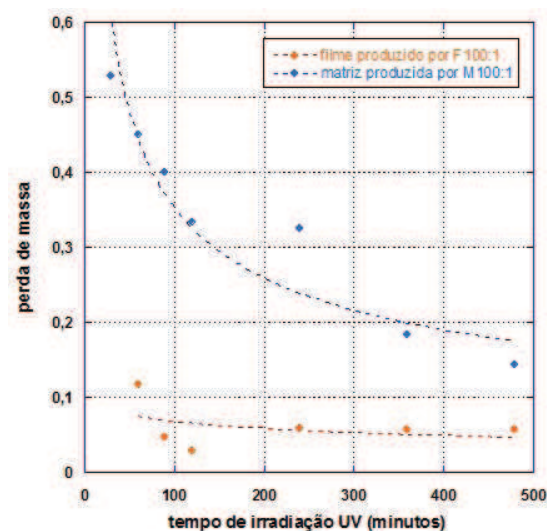
(a) F0 e M0



(b) F100:1 e M100:1



(c) F0 e M0



(d) F100:1 e M100:1

Figura 3.4: Grau de inchamento ( (a) e (b) ) e perda de massa ( (c) e (d) ) dos filmes (laranja) e matrizes (azul) produzidos a partir das soluções poliméricas S0 e S100:1 em função dos tempos de irradiação UV.



### 3.3 Espectrofotometria de UV-Visível

#### 3.3.1 Formação das nanopartículas de prata

Neste trabalho, os íons de prata ( $\text{Ag}^+$ ) presentes nas nanofibras de PVP produzidas a partir de soluções contendo  $\text{AgNO}_3$ , foram reduzidos para NPs ( $\text{Ag}_0$ ) através da exposição a radiação UV [Xu and Zhou, 2008]:

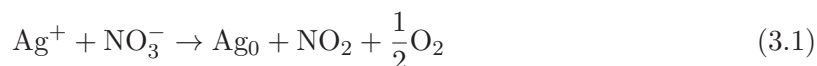


Figura 3.5: Fotografia das matrizes M200:1, M100:1 e M50:1, respectivamente, após submetidas a 4 horas de radiação UV.

Ao longo do processo de irradiação UV das matrizes de nanofibras que continham  $\text{AgNO}_3$ , observou-se uma mudança de cor, de branco para acastanhado, reveladora da formação de NPs. Em geral, para um mesmo tempo de irradiação, a cor é tanto mais intensa quanto maior a concentração de  $\text{AgNO}_3$  da solução precursora das matrizes (ver figura 3.5). À medida que o tempo de irradiação aumenta a cor tende também a acentuar-se como se mostra na figura 3.6 para o filme F100:1.

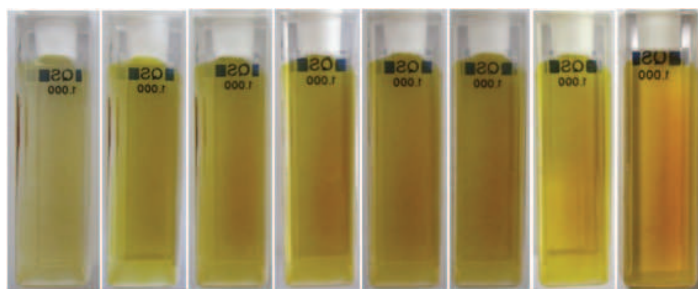


Figura 3.6: Fotografia da célula de quartzo com filme F100:1 sujeito a diferentes tempos de irradiação UV :15,30,45,60,90,120,240,360 minutos.

A figura 3.7 mostra os gráficos obtidos por espectrofotometria de UV-Visível dos filmes F0, F200:1, F100:1 e F50:1 após exposição de 15, 30, 60,90,120, 240, 360 e 480 minutos a radiação UV.

O gráfico 3.7a representa o espectro do filme F0, obtido a partir da solução S0 de PVP sem  $\text{AgNO}_3$ . As alterações visíveis nos espectros para diferentes tempos de irradiação são devidas à reticulação do polímero. Com o aumento de exposição a radiação UV pode observar-se um aumento de absorvância no intervalo de c.d.o entre 250 – 350 nm que pode ser devido à criação de ligações cruzadas e outros cromóforos <sup>1</sup>.

Sionkwaska *et al* (2008) [Sionkowska et al., 2009] analisou as bandas de Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR, do inglês, *Fourier Transform Infrared Spectroscopy*) para o PVP. Verificou que a alteração mais significativa foi a da banda do grupo hidroxilo (-OH) que diminuiu de intensidade e se deslocou para frequências mais baixas, mostrando a perda de ligações de hidrogénio com o aumento do tempo de irradiação. Detectou ainda a diminuição da área subjacente aos picos correspondentes a várias ligações (-OH, -CH<sub>2</sub>, C=O e C-H). Estas observações indicam que com o aumento da exposição a radiação UV ocorrem processos de quebra de ligações por absorção de luz (fotólise). A fotólise conduz à formação de macrorradicais que ao recombinarem-se originam a reticulação do polímero.

Os gráficos 3.7b, 3.7c e 3.7d correspondem aos filmes, F200:1, F100:1 e F50:1, respectivamente. Estes gráficos mostram a presença de dois picos de absorvância: um pico cujo máximo ronda os 290 nm e que está relacionado com a reticulação do PVP e outro pico com máximo entre os 410 - 430 nm característico da SPR das NPs. É interessante notar que a proporção entre a intensidade dos dois picos se altera com a quantidade de  $\text{AgNO}_3$  usada. Para os tempos de irradiação mais elevados a intensidade do pico a 290 nm é maior do que a do pico da SPR para a maior quantidade de  $\text{AgNO}_3$  (F50:1) mas esta relação inverte para quantidades menores de  $\text{AgNO}_3$ . Isto sugere que a presença de prata possa ter alguma influência no processo de reticulação.

Os valores de absorvância obtidos para os diferentes filmes não são directamente comparáveis já que dependem da espessura do filme depositado na cuvete: quanto maior for a espessura, maior será a absorvância medida. No entanto, estes espectros permitem avaliar em cada filme a evolução tanto do número de NPs formadas em função do tempo de exposição do filme à radiação UV bem como das suas características. Verificou-se que a intensidade da banda de absorvância SPR está relacionada com o aumento do tempo de irradiação UV: com o aumento da exposição à radiação UV a intensidade do máximo deste pico aumentou gradualmente (ver gráfico 3.8a) e o máximo deslocou-se para c.d.o maiores (ver gráfico 3.8b).

A partir de determinados valores do tempo de exposição dos filmes a radiação UV a intensidade do pico de SPR estabiliza como mostram os patamares das curvas no gráfico 3.8a. Este comportamento revela alguma estabilização no número e tamanho das NPs. A estabilização das NPs depende não só da quantidade de iões de prata que podem ser reduzidos e da eficiência do processo de redução como também do processo de aglomeração: mesmo se a quantidade

<sup>1</sup>Região de uma molécula onde a diferença de níveis energéticos corresponde à energia de radiação visível. Consequentemente, a desexcitação destes níveis é acompanhada pela emissão de luz visível cuja cor depende do valor particular desta energia (ou c.d.o do fotão emitido na transição electrónica entre os níveis).

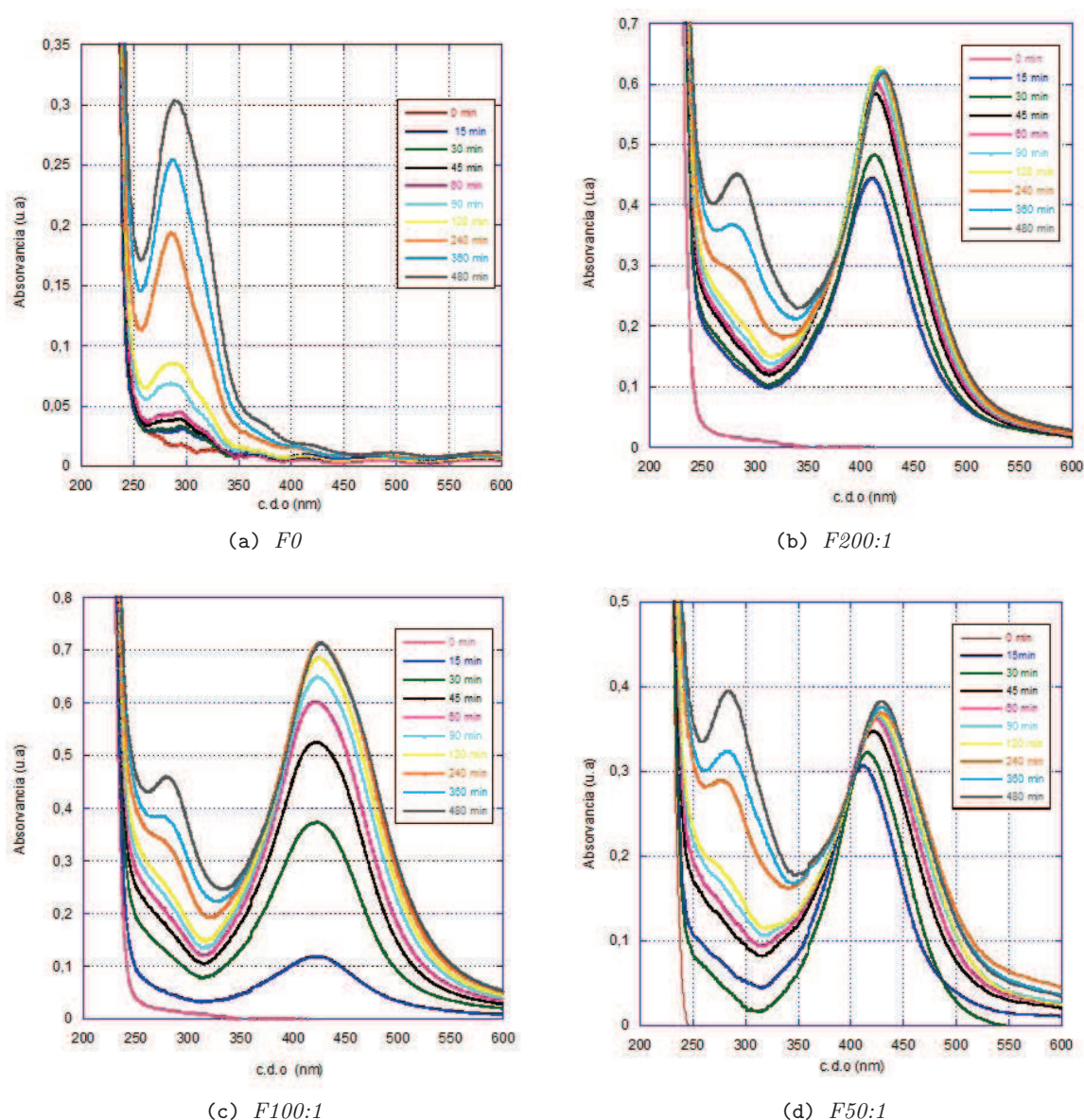


Figura 3.7: Espectros de UV-Vis dos filmes *F0*, *F200:1*, *F100:1* e *F50:1* após terem sido irradiados com radiação UV por diferentes períodos de tempo: 15, 30, 45, 60, 90, 120, 240, 360 e 480 minutos.

de prata reduzida não variar, pode ocorrer uma variação de tamanho devido ao processo de aglomeração acompanhada de uma diminuição do número de NPs [Son et al., 2006].

O gráfico 3.8b revela a tendência de uma maior quantidade de  $\text{AgNO}_3$  incorporada nos filmes tornar superiores os valores de c.d.o. associados ao máximo da banda SPR. Assim, para os filmes *F200:1*, *F100:1* e *F50:1* observaram-se, respectivamente, os seguintes intervalos de c.d.o. para o máximo: 413-421 nm, 421-428 nm e 416-429 nm, respectivamente. Mie *et al* mostrou que a localização da SPR depende explicitamente do raio da partícula, deslocando-se



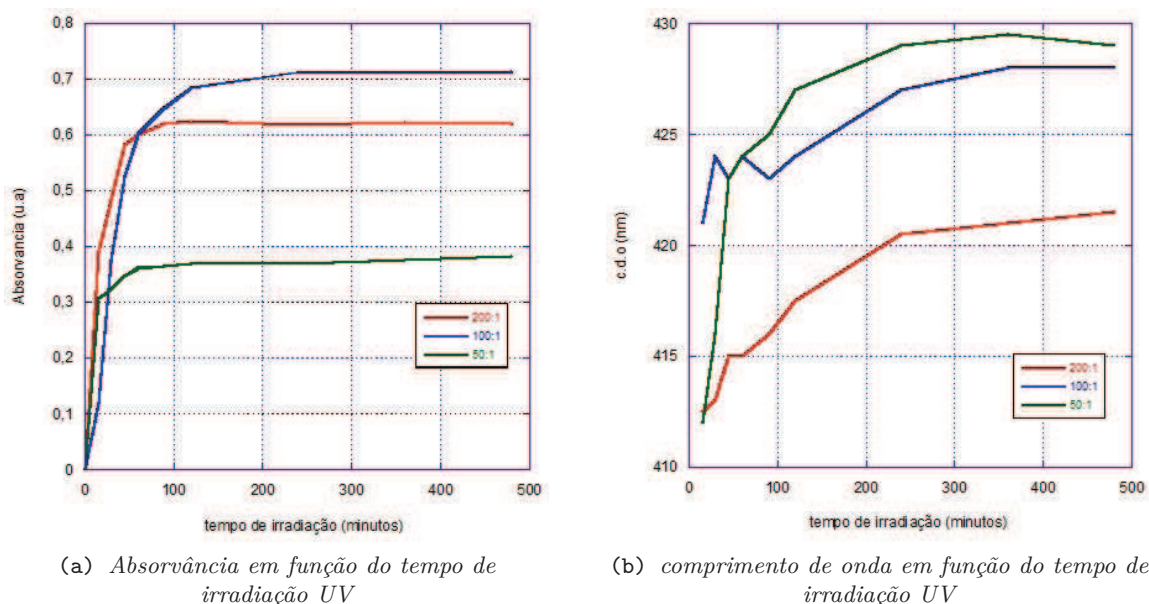


Figura 3.8: Representação gráfica da absorvância e do c.d.o em função dos tempos de exposição a radiação UV, dos filmes de F200:1, F100:1 e F50:1.

para maiores c.d.o quanto maior for este tamanho [Darroudi et al., 2011, Lobo, 2009]. Assim, o desvio para maiores comprimentos de onda acima referido sugere que o tamanho das NPs formadas aumenta com a quantidade de AgNO<sub>3</sub> incorporada nos filmes.

Neste trabalho as NPs foram obtidas através da exposição a radiação UV. Como dito na secção 1.7 o PVP tem, neste processo, um papel estabilizador das NPs, reduzindo a probabilidade de ocorrer aglomeração. Quanto maior for a proporção de AgNO<sub>3</sub> para PVP, menor será o efeito estabilizador formando-se NPs maiores devido a uma maior aglomeração.

A largura a meia altura (FWHM do inglês, *Full Width at Half Maximum*) da banda de absorção é uma indicação da distribuição do tamanho das NPs. Uma análise qualitativa dos espectros dos filmes permite observar para os tempos de irradiação dos filmes maiores um aumento desta largura com o tempo de irradiação o que sugere que o processo de aglomeração ainda decorre.

### 3.3.2 Libertação de nanopartículas de prata para água

Inicialmente foi utilizada uma amostra do filme F100:1 com uma área de 20 x 20 mm<sup>2</sup> e uma massa de 0,36 g reticulado 4 horas para fazer uma primeira avaliação da detecção por espectrofotometria de UV-vis das NPs libertadas para água. O filme foi colocado em 3 ml de água destilada. Após 24 horas observou-se que a fase líquida tinha adquirido um tom amarelado e que apresentava um aspecto uniforme. Foi então efectuada a medição da absorvância desta suspensão coloidal de NPs obtendo-se o gráfico que se apresenta na figura 3.9. Este gráfico revela a presença da banda de absorção SPR, correspondente às NPs com um

máximo localizado por volta dos 425 nm coincidente com a posição do pico SPR identificado no espectro UV-vis do filme F100:1. Tendo em conta a massa do filme utilizado e a intensidade da absorvância, estimou-se a massa das amostras a utilizar nos ensaios de detecção das NPs libertadas das matrizes para água.

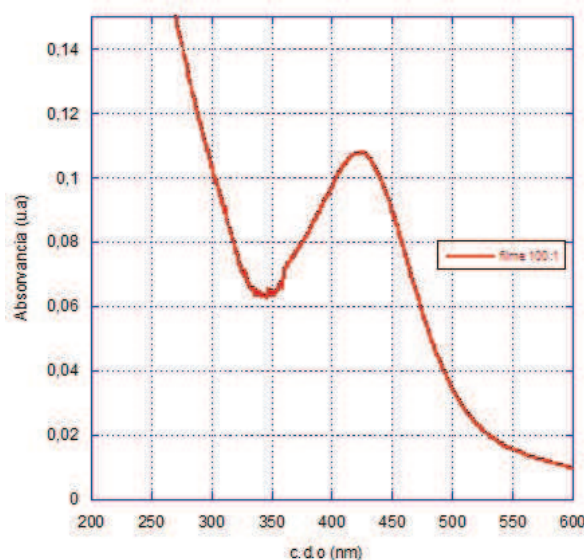


Figura 3.9: Espectro de UV-vis para detectar a presença de nanopartículas de prata libertadas para água do filme F100:1.

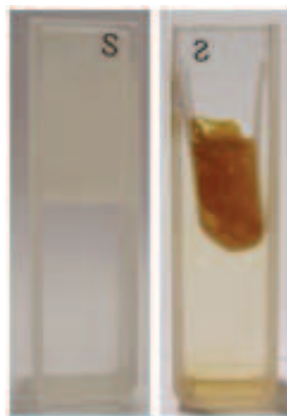


Figura 3.10: Matriz M0 (à esquerda) e M100:1 (à direita) depois de reticuladas 4 horas. As matrizes estão colocadas em células de quartzo com água destilada e suportadas por uma rede acima da zona de passagem do feixe de luz.

Os testes de libertação para água a partir das matrizes foram realizados com matrizes previamente submetidas a 4 horas de reticulação por irradiação UV. Para este tempo tanto os valores do grau de inchamento e da perda de massa como a quantidade de NPs formadas começavam a estabilizar de acordo com os resultados apresentados nas secções 3.2 e 3.3.1.

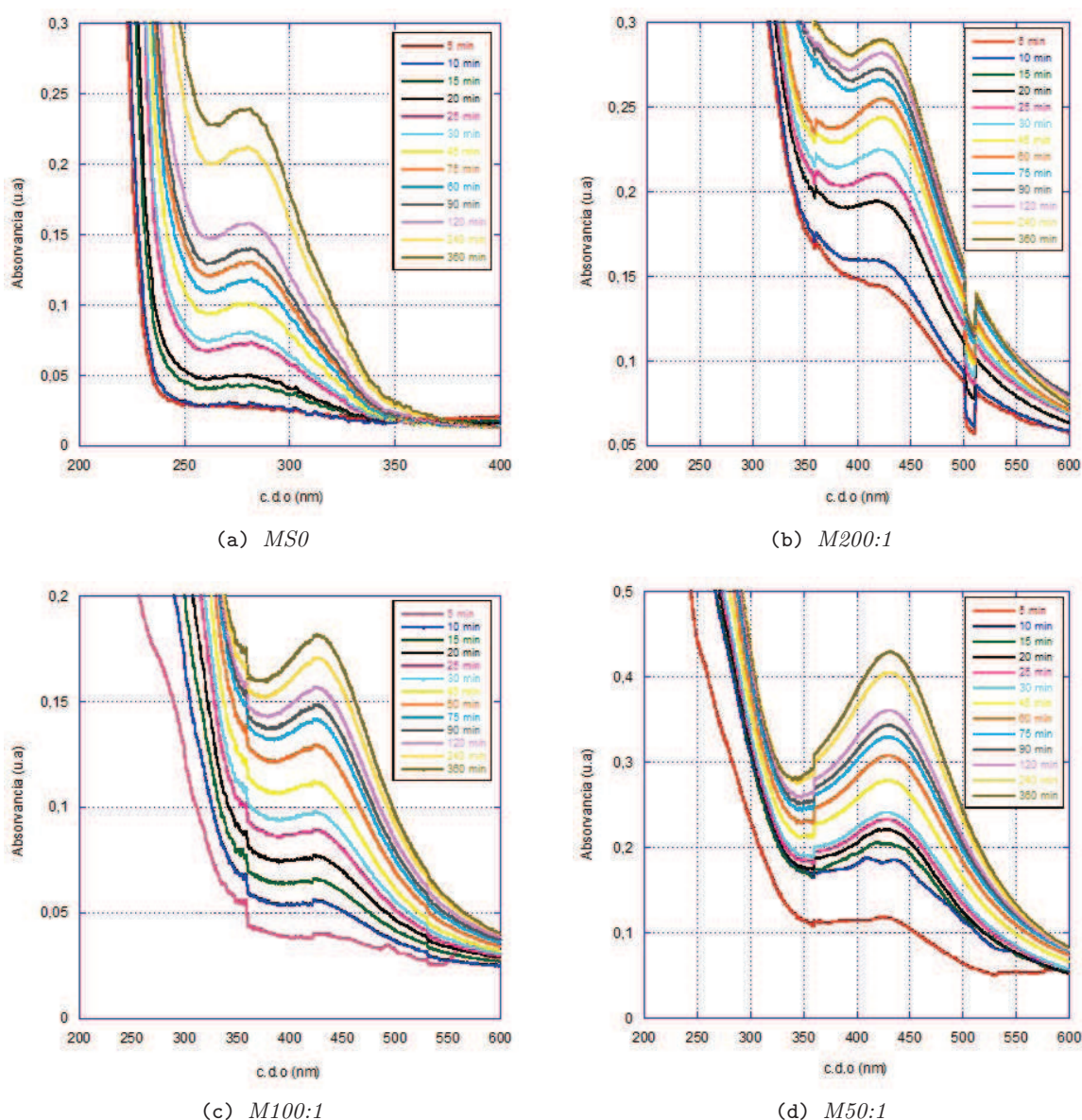
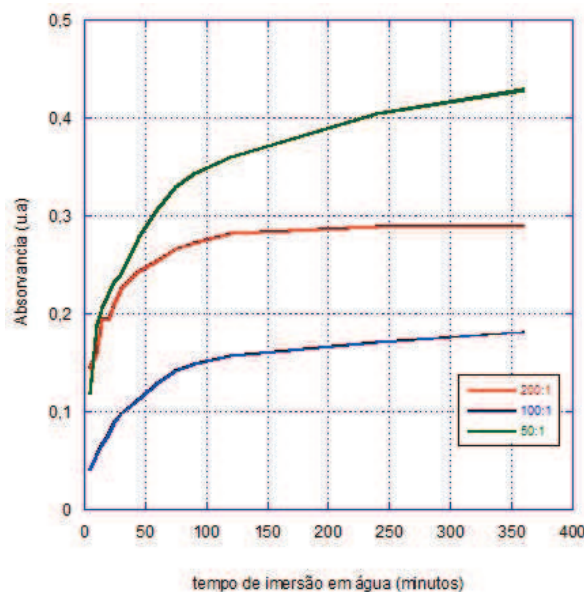


Figura 3.11: Medições de espectrofotometria de UV-vis do meio líquido em contacto com matrizes de nanofibras depois de irradiadas por 4 h. Foram analisadas amostras das matrizes M0, M200:1, M100:1 e M50:1 colocadas em 3 ml de água destilada ao fim de 5, 10, 15, 20, 25, 30, 45, 60, 75, 90, 120, 240 e 360 minutos de imersão.

A figura 3.10 apresenta as fotografias das células de quartzo com matrizes de nanofibras em água no decorrer dos ensaios de libertação.

Ocorreu libertação de NPs a partir do momento em que as matrizes entraram em contacto com a água, observando-se de imediato uma mudança de cor da água para uma cor acastanhada. A espectrofotometria de UV-vis permitiu avaliar a taxa de libertação de NPs para água através da evolução da banda de absorvância de SPR ao longo do tempo de imersão.



**Figura 3.12:** Absorvâncias do meio líquido onde se encontram imersas matrizes de nanofibras com NPs em função do tempo de imersão. Os valores de absorvância correspondem ao comprimento de onda do máximo da SPR das NPs libertadas.

Os gráficos da figura 3.11 mostram os espectros correspondentes às matrizes M0, M200:1, M100:1 e M50:1, colocadas em 3 ml de água após 4 h de irradiação UV. Para cada matriz foram efectuados espectros ao fim de 5, 10, 15, 20, 25, 30, 45, 60, 75, 90, 120, 240 e 360 minutos.

No gráfico 3.11a correspondente à matriz de PVP (M0) mostra o aumento da intensidade da banda de absorvância situado em torno dos 290 nm com o tempo de imersão em água. Esta banda que passa a fazer parte do espectro de absorvância do polímero após exposição a radiação UV (ver gráfico 3.7a), aumenta devido ao aumento da concentração de PVP na água destilada.

A partir dos gráficos 3.11b, 3.11c e 3.11d construiu-se o gráfico 3.12 que representa o máximo de absorvância lida da banda SPR de cada espectro obtido ao fim dos diferentes tempos de imersão em água das várias matrizes em água.

Da análise deste gráfico podemos concluir que nas primeiras 2 horas há um aumento da absorvância com o tempo de imersão. A taxa de variação da absorvância diminui com o tempo de imersão sendo muito baixa a partir das 4 horas. Assim a taxa de libertação das NPs das matrizes de nanofibras é mais acentuada no início da imersão. A diminuição da velocidade da libertação das NPs para água pode ser explicada pela extinção das NPs incorporadas nas matrizes.

Portanto, prevê-se que quando uma matriz contendo NPs for colocada sobre uma ferida ou queimadura, liberte rapidamente NPs devido ao contacto com o exsudado. Esta característica pode ter influência não só na benéfica e rápida actuação sobre microrganismos invasores como

também na resposta do próprio tecido com possíveis consequências no processo de regeneração. Estes resultados vão de encontro ao desejado.

### 3.4 Estudo da morfologia das nanopartículas de prata

Com o objectivo de observar a morfologia e o tamanho das nanopartículas de prata (NPs) produzidas por irradiação UV das matrizes de nanofibras recorreu-se a imagens obtidas por Microscopia Electrónica de Transmissão (TEM). As partículas observadas possuem uma geometria mais ou menos esférica. O seu diâmetro foi medido como descrito na secção 2.5. Para estudar o efeito da proporção de  $\text{AgNO}_3$  em relação ao PVP utilizaram-se as matrizes M200:1, M100:1 e M50:1 com o mesmo tempo de irradiação UV (240 minutos) e para o estudo da influência do tempo de exposição a radiação UV utilizou-se a matriz M100:1 sujeita a vários tempos de irradiação UV (30, 60, 120, 240, 360 e 480 minutos).

#### 3.4.1 Efeito da variação da proporção de PVP para $\text{AgNO}_3$

A figura 3.13 ilustra as diferentes matrizes de PVP obtidas a partir das soluções com diferentes quantidades de  $\text{AgNO}_3$  após 240 minutos de exposição a radiação UV. Como se pode observar, as NPs encontravam-se dispersas pelas nanofibras. Tanto o tamanho como a distribuição das NPs sofrem algumas alterações com o aumento de  $\text{AgNO}_3$ . Os diâmetros das NPs foram medidos de acordo com o descrito em 2.5 e com eles foram construídos os histogramas referentes às imagens apresentadas que também são apresentados na figura 3.13.

Na tabela 3.4 são apresentados os valores médios do tamanho das nanopartículas correspondentes aos histogramas da figura 3.13. Os resultados apresentados permitem concluir que o tamanho das NPs aumenta directamente com o aumento da proporção de  $\text{AgNO}_3$  nas soluções precursoras das matrizes. Este facto está relacionado com a acção que o PVP tem como estabilizador do tamanho das NPs inibindo o seu crescimento (ver secção 1.7). Para proporções maiores do agente estabilizador relativamente ao  $\text{AgNO}_3$ , formando-se partículas mais pequenas e esféricas e com uma distribuição mais uniforme. Com o decréscimo do agente estabilizador, as NPs aumentam de tamanho e, devido à sua aglomeração, tomam uma forma não esférica e a sua distribuição torna-se não-uniforme como se evidencia na figura 3.13.

**Tabela 3.4:** Representação do tamanho das nanopartículas de prata presentes nas matrizes de nanofibras M200:1, M100:1 e M50:1.

Matrizes	Tamanho médio das NPs
M200:1	$2,17 \pm 0,45$
M100:1	$2,75 \pm 0,49$
M50:1 (A)	$4,35 \pm 1,35$
M50:1 (B)	$2,68 \pm 0,44$



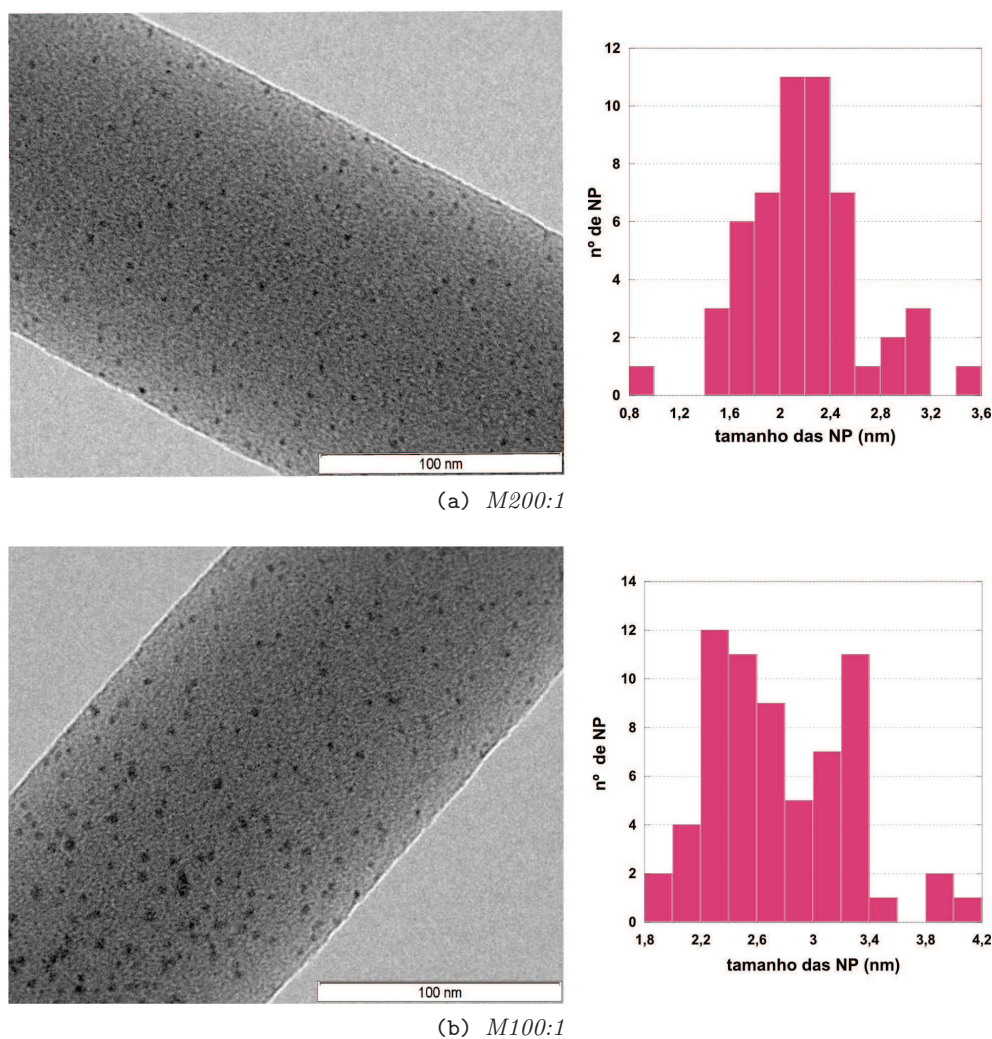


Figura 3.13: Imagens de TEM das matrizes de nanofibras (a) *M200:1*, (b) *M100:1* e (c) *M50:1* após 240 minutos de exposição a radiação UV. Junto a cada imagem são apresentados os correspondentes histogramas dos tamanhos das nanopartículas.

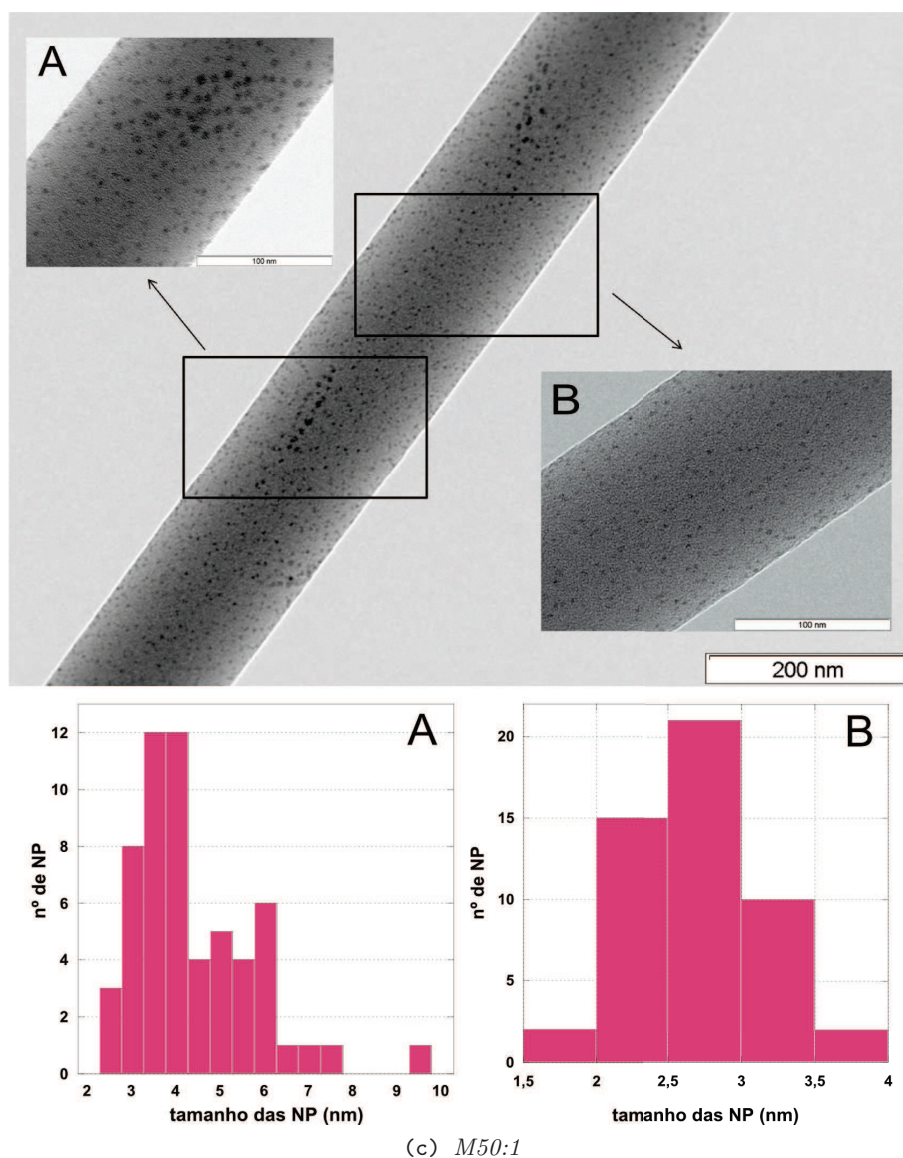


Figura 3.13: Imagens de TEM das matrizes de nanofibras (a) M200:1, (b) M100:1 e (c) M50:1 após 240 minutos de exposição a radiação UV. Junto a cada imagem são apresentados os correspondentes histogramas dos tamanhos das nanopartículas.



### 3.4.2 Efeito da variação do tempo de irradiação UV

Na figura 3.15 observam-se as imagens de TEM da matriz M100:1 quando exposta a diferentes tempos de irradiação UV. Com o aumento do tempo de irradiação verificou-se um crescimento do tamanho das NPs e a sua distribuição nas nanofibras tornou-se gradualmente menos uniforme (ver figura 3.14). Até aos 120 minutos as NPs mantiveram uma forma esférica e estavam uniformemente distribuídas. A partir dos 240 até aos 480 minutos de irradiação UV observou-se um crescimento acentuado das NPs. Tanto as imagens 3.15e e 3.15f como o gráfico da figura 3.14 revelam que a dispersão no tamanho das NPs é muito considerável para os maiores tempos de irradiação. A imagem 3.15e evidencia uma grande discrepância no tamanho e forma das NPs com a formação de grandes aglomerados. Estas variações na morfologia das NPs sugere que com o aumento da exposição à radiação UV ocorra degradação do polímero e, consequentemente, este perca o efeito estabilizador. Deste modo, e aliado ao crescimento das NPs quando sujeitas a radiação UV, as NPs aglomeraram-se dando origem a aglomerados não esféricos. As imagens de TEM acabadas de analisar (figuras 3.13, 3.15 e 3.14) são consistentes com o que foi proposto na secção 3.3.

No gráfico 3.8b desta secção observou-se que tanto o aumento da proporção de  $\text{AgNO}_3$  para PVP em filmes irradiados por um mesmo período de tempo bem como o aumento do tempo de exposição a radiação UV de filmes com uma determinada proporção de  $\text{AgNO}_3$  para PVP, provocaram desvios para maiores c.d.o no pico de absorvância correspondente à SPR das NPs. Estes desvios foram então associados à formação de NPs maiores como as imagens de TEM acabaram por revelar acontecer nas fibras em situações semelhantes. Estes resultados vão de encontro ao esperado, no sentido de que com o aumento da concentração de  $\text{AgNO}_3$  nas soluções precursoras de matrizes de nanofibras e com o aumento de exposição a radiação UV, as NPs aumentam de diâmetro e de concentração. Desta forma conclui-se ser possível controlar estes parâmetros através das técnicas descritas. Isto permite uma avaliação posterior do efeito biocida das NPs em função do seu diâmetro médio e da sua concentração.

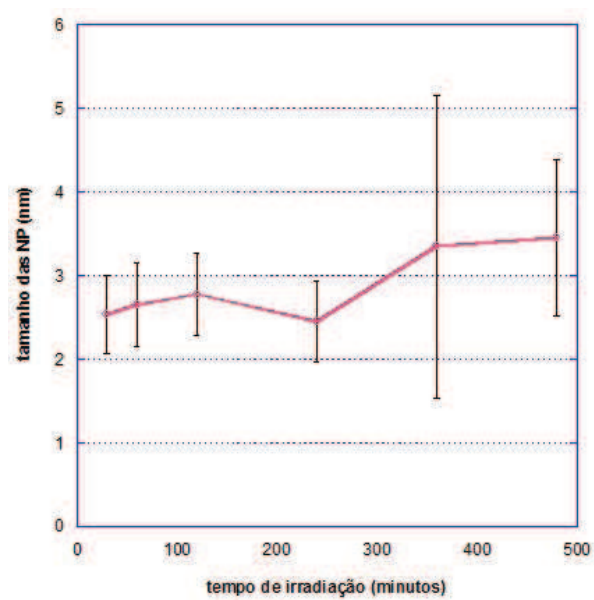


Figura 3.14: Representação gráfica do tamanho médio das nanopartículas de prata observadas nas fibras da matriz M100:1 em função do tempo de exposição a radiação UV.

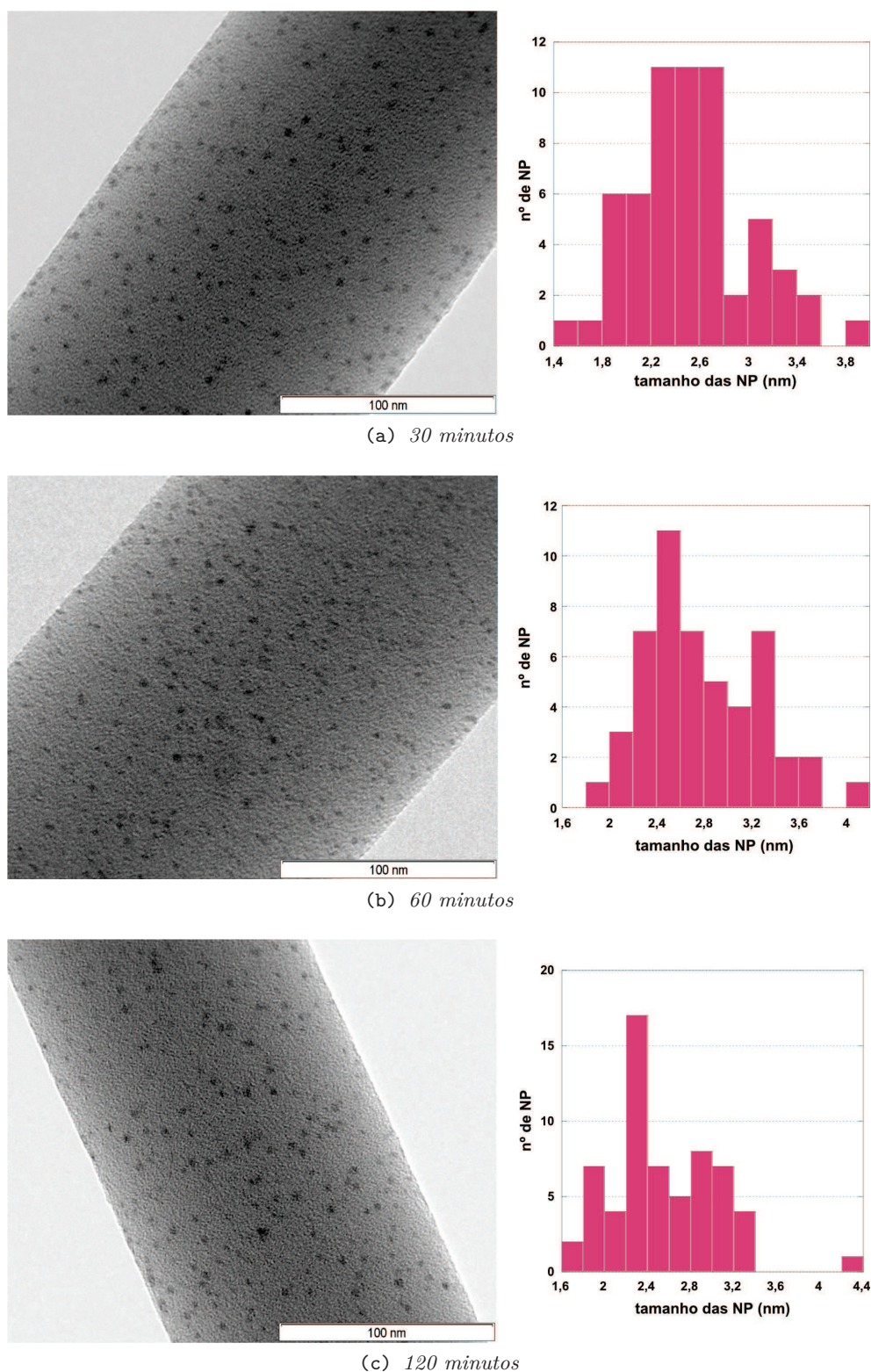
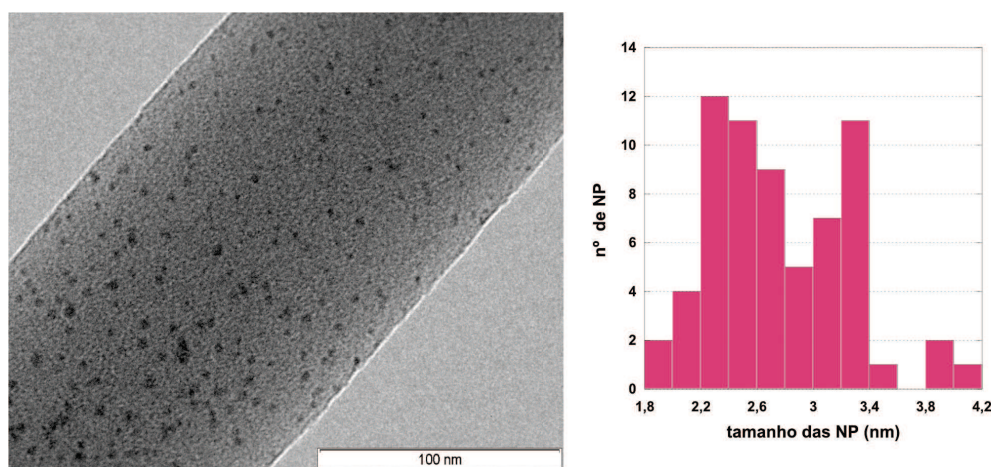
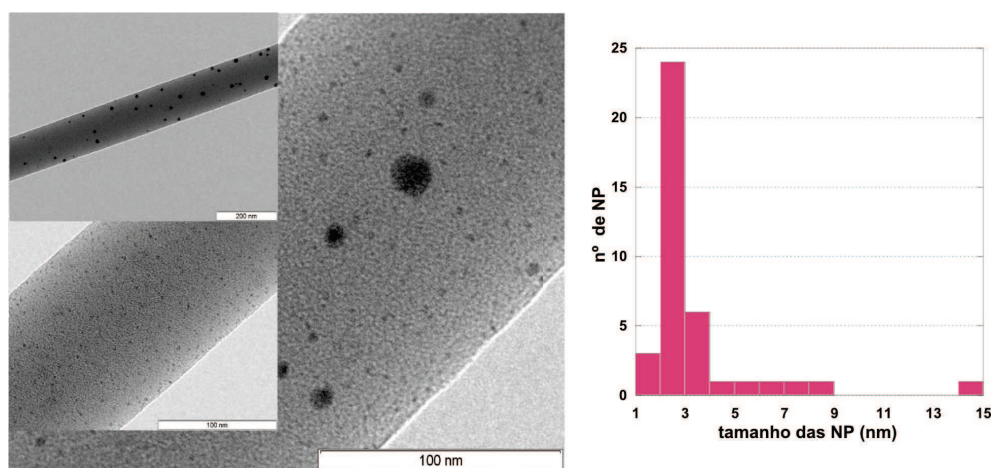


Figura 3.15: *Imagens de Microscopia Electrónica de Transmissão de fibras correspondentes à matriz M100:1 irradiada com UV durante (a) 30 (b) 60 (c) 120 (d) 240 (e) 360 e (f) 480 minutos. (o histograma correspondente à imagem (e) mostra o resultado das medições efectuadas nas imagens ampliadas).*

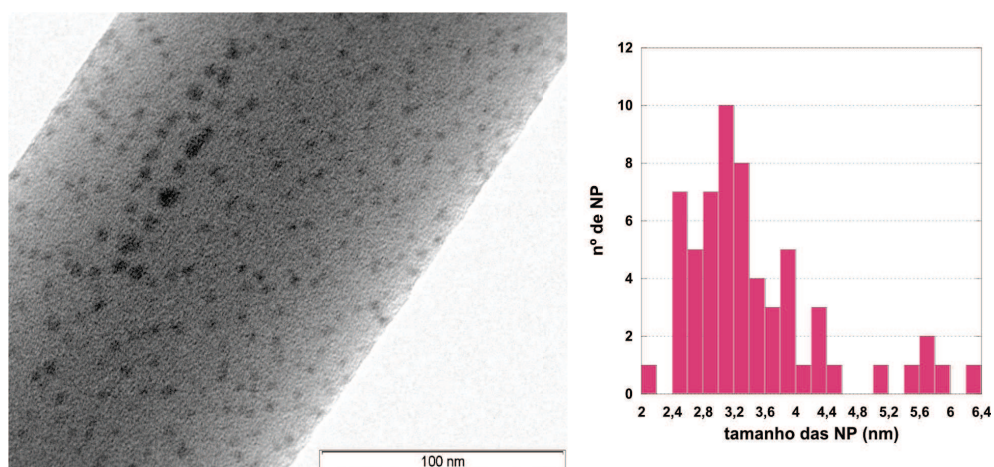




(d) 240 minutos



(e) 360 minutos



(f) 480 minutos

Figura 3.15: Imagens de Microscopia Electrónica de Transmissão de fibras correspondentes à matriz M100:1 irradiada com UV durante (a) 30 (b) 60 (c) 120 (d) 240 (e) 360 e (f) 480 minutos. (o histograma correspondente à imagem (e) mostra o resultado das medições efectuadas nas imagens ampliadas).

### 3.5 Testes Microbiológicos

Com o objectivo de testar a actividade antimicrobiana das matrizes de nanofibras com nanopartículas de prata (NPs) incorporadas recorreu-se a testes microbiológicos: determinação do valor da concentração mínima inibitória (MIC, do inglês *Minimal Inhibitory Concentration*) e testes de difusão por disco pelo método de Kirby-Bauer. Para a realização dos testes utilizaram-se bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*) e Gram-negativas (*Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*) e o fungo *Candida albicans* (ver tabela 3.5).

**Tabela 3.5:** Ensaio realizado para testar a susceptibilidade dos microrganismos em relação às nanopartículas de prata. Foram realizados testes de determinação de Concentração Mínima Inibitória e testes pelo método de Kirby-Bauer.

Estirpe	Ensaio de susceptibilidade às NPs
<i>S.aureus</i>	Concentração mínima inibitória e Método de Kirby -Bauer
<i>S.epidermis</i>	Método de Kirby -Bauer
<i>P.aeruginosa</i>	Método de Kirby -Bauer
<i>E. coli</i>	Método de Kirby -Bauer
<i>C.albicans</i>	Método de Kirby -Bauer

#### 3.5.1 Determinação da Concentração Mínima Inibitória

Usualmente para determinação da MIC utilizam-se diferentes diluições do agente inibidor para determinar qual a concentração mínima do mesmo capaz de inibir o crescimento das células do microrganismo. Porém, neste trabalho, o agente antimicrobiano testado - as nanopartículas de prata - estavam incorporadas nas matrizes de nanofibras onde foram formadas por fotoredução. Assim, a MIC foi determinada variando a massa das matrizes de nanofibras colocada em contacto em determinado volume de meio com as células. Será indicada como MIC o valor mínimo da massa da matriz por unidade de volume que conduziu à inibição do crescimento das células.

Começou por realizar-se o teste de MIC para a estirpe *S.aureus* e para a matriz M100:1 exposta a 4 horas de radiação UV. Com o intuito de determinar a massa de M100:1 necessária para inibir o crescimento bacteriano estipulou-se uma gama de massas de M100:1 a testar: 1, 5, 10, 15, 20, 25, 50 e 100 mg. Cada amostra foi colocada num tubo de 50 ml que continha previamente 10 ml de meio de cultura e 10 µl de cultura bacteriana com uma concentração de  $10^7$ CFU/ml.

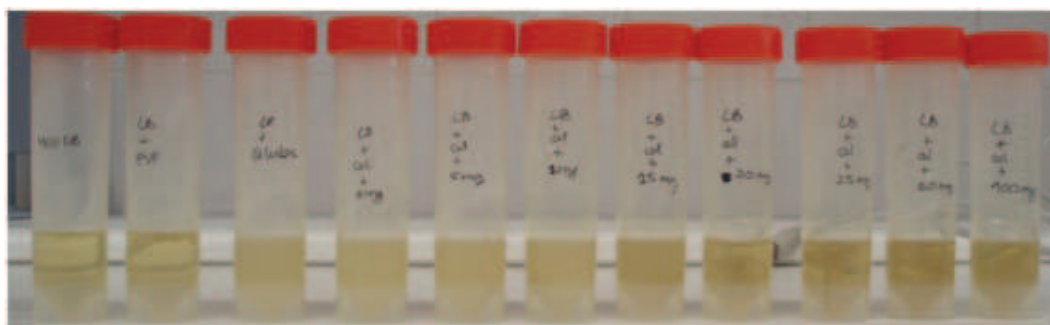
O meio de cultura com as amostras e os respectivos controlos foram incubados durante 18h-24h. Os testes de controlo confirmaram que os testes foram realizados em condições de asséptica (ver tabela 3.6).

A tabela 3.6 resume os resultados obtidos dos três ensaios de MIC realizados. Pela observação dos tubos, a presença (+, positivo) ou ausência (-, negativo) de turvação representa o crescimento ou inibição da cultura bacteriana, respectivamente. As medições de densidade óptica a 600 nm ( $DO_{600}$ ) e a contagem de células (ver figura 3.17) efectuadas ao fim de um período de incubação/ao fim de 24 horas corroboram os resultados da tabela 3.6 : na ausência de matriz a concentração celular, inicialmente de  $10^4$  CFU/ml, sobe para  $10^9$  CFU/ml, enquanto que na presença de 25 mg de matriz na suspensão bacteriana (2,5 mg/ml) a concentração celular sobe para apenas  $10^6$  CFU/ml. Para uma massa de matriz de 100 mg (10mg/ml) não se observa crescimento celular. Verifica-se assim que tanto a  $DO_{600}$  como a CFU/ml tendem a diminuir significativamente por volta das 20 mg de matriz, confirmando a inibição do crescimento bacteriano.

**Tabela 3.6:** Resultados obtidos visualmente nos ensaios para a determinação do valor da concentração mínima inibitória realizados com diferentes quantidades de massa de matriz de nanofibras M100:1. O sinal + (positivo) e o sinal - (negativo) representam a presença ou ausência de turvação, havendo o crescimento ou inibição da cultura bacteriana, respectivamente.

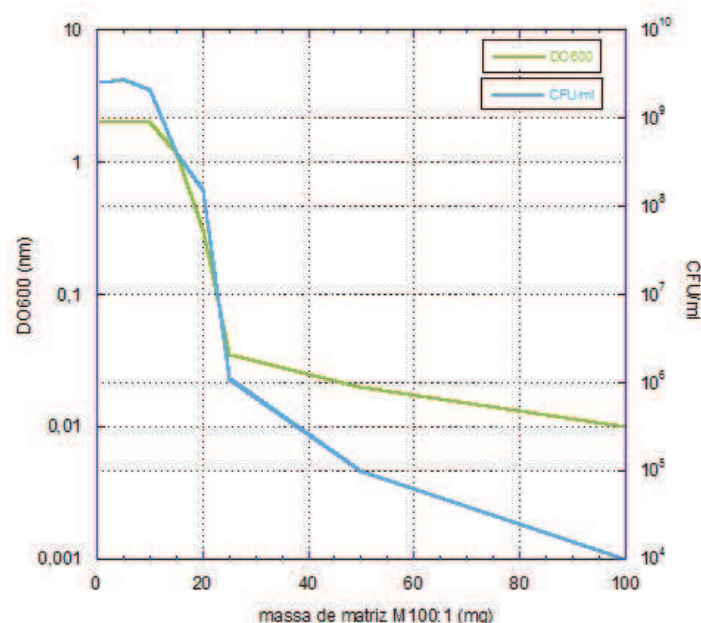
Ensaio	Controlos de esterilidade			Massas de M100:1 (mg)							
	Controlo meio LB	Controlo meio LB + células	Meio LB + matriz PVP	1	5	10	15	20	25	50	100
1ºEnsaio	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-
2ºEnsaio	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-
3ºEnsaio	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-

Na figura 3.16 é apresentado o primeiro ensaio realizado, na qual se consegue observar a mudança de turvação do tubo com 15 mg (positivo, turvo) de matriz para o tubo com 20mg de matriz (negativo, límpido).



**Figura 3.16:** Apresentação dos resultados do primeiro ensaio para o teste da concentração mínima inibitória, onde se pode visualizar a turvação das culturas bacterianas para as diferentes massas de matriz de nanofibras M100:1. Da esquerda para a direita observam-se os tubos de: controlo de meio LB, meio LB com matriz de PVP, meio LB com células, e os testes com amostras da matriz de nanofibras M100:1 irradiada 4 horas com massas 1,5,10,15,20,25,50 e 100 mg, respectivamente.

Como se pode constatar na tabela 3.6, os resultados de MIC obtidos nos três ensaios realizados não concordantes. Assim, não foi possível determinar um valor da MIC. A variabilidade dos resultados de MIC pode dever-se a alterações das condições de realização dos testes. Por exemplo podem ter ocorrido variações no processo de formação das NPs e partículas com diferentes características poderão ter uma acção diferente nos microorganismos. A dispersão das NPs libertadas para cultura durante o ensaio pode também ter ocorrido de forma diversa.



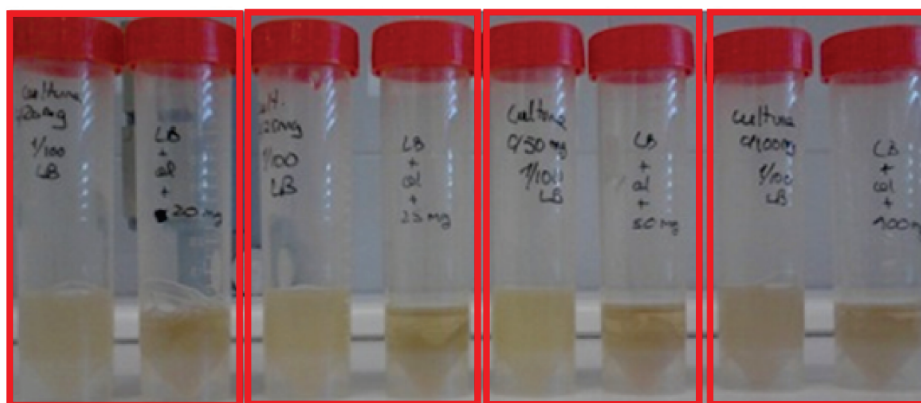
**Figura 3.17:** Representação gráfica da densidade óptica a 600 nm ( $DO_{600}$ ) e da concentração celular (CFU/ml) dos resultados obtidos no primeiro ensaio em função da variação das massas das matrizes de nanofibras M100:1.

Após o tempo de incubação de novas culturas efectuadas para realizar os testes do tipo de efeito das NPs sobre as bactérias, as células voltaram a multiplicar-se tornando o meio de cultura turvo (ver figura 3.18). Deste modo, pode-se concluir que as NPs possuem um efeito bacteriostático, pois as bactérias que estavam inibidas voltaram a multiplicar-se quando colocadas em novo meio de cultura. Contudo, as bactérias podem ter sofrido mudanças genéticas e algumas bactérias podem ter sofrido lise celular, o que não foi possível aferir.

Após a determinação da MIC e dos testes efectuados para avaliação do efeito das NPs sobre as culturas bacterianas, foi interessante estudar a evolução destas culturas na presença e ausência de matriz M100:1, irradiada 4h, durante um período de 24 horas. Utilizou-se uma massa de matriz de 25 mg, determinada pela observação dos resultados de MIC.

Esta massa de matriz foi colocada num volume de 20 ml cultura bacteriana (a cultura bacteriana utilizada foi preparada através da adição de 2  $\mu$ l de uma cultura bacteriana com uma concentração celular de  $10^7$  CFU/ml em 20 ml de meio de cultura LB). Considerou-se ainda uma cultura bacteriana semelhante mas onde não foi colocada matriz.





**Figura 3.18:** Evidência do efeito bacteriostático da matriz M100:1 com NPs incorporadas (4h de irradiação UV) sobre as culturas da estirpe *S.aureus*. Cada par de tubos corresponde a um teste realizado colocando um inóculo da cultura bacteriana inibida pela presença de matriz (tubo da direita) em novo meio de cultura LB (tubo da esquerda). Os vários pares dizem respeito a culturas inibidas por diferentes quantidades de matriz: 20, 25, 50 e 100mg da esquerda para a direita. O surgimento de turbidez evidência ter ocorrido multiplicação celular no novo meio.

Ao longo das primeiras 8 horas foram efectuadas medições de densidade óptica de hora a hora e das 8h até às 24 horas apenas se realizou uma única medição às 24 horas. Em cada tempo retirou-se um 1ml das culturas sem e com matriz M100:1, mediram-se as  $DO_{600}$  e efectuaram-se as contagens de células (CFU/ml). Para a contagem de células realizaram-se as diluições necessárias para ser possível obter colónias isoladas.

A tabela 3.7 resume os resultados de turvação obtidos ao longo das 24 horas de medições. Como se constata na figura 3.7, na cultura com a matriz não existiu turvação (sinal negativo, -) ao fim de 24 horas de incubação, podendo concluir-se que a inibição da multiplicação celular existe pelo menos durante 24 horas. Ao contrário, na cultura sem matriz M100:1 observou-se turvação a partir das 4 horas de incubação e a concentração celular, inicialmente com um valor de  $10^3$  CFU/ml, cresceu até uma concentração de  $10^9$  CFU/ml como se verifica no gráfico da figura 3.20.

**Tabela 3.7:** Resultados da evolução da turvação da cultura bacteriana de *S.aureus* ( $10^3$  CFU/ml) em função do tempo na presença e na ausência da matriz de nanofibras com NPs incorporadas (M100:1 com massa uma 25mg). O sinal + (positivo) e o sinal (negativo) representam, respectivamente, a presença ou ausência de turvação.

	Tempos das medições (horas)									
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	24
<b>Cultura sem M100:1</b>	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
<b>Cultura com M100:1</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Para a cultura bacteriana na presença de matriz tanto a  $DO_{600}$  como a contagem de células sobem ligeiramente durante as primeiras 5 horas, mantendo-se depois aproximadamente



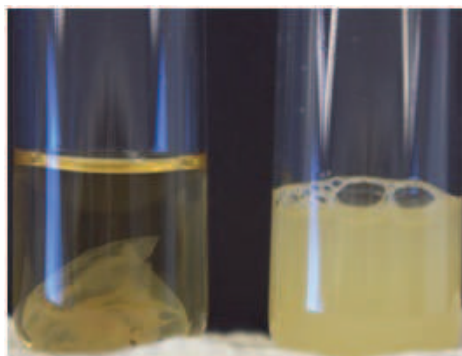


Figura 3.19: Comparação dos resultados obtidos com e sem a matriz M100:1 (25mg) com NPs incorporadas sobre a cultura bacteriana de *S.aureus*, ao fim de 24 horas. À esquerda, na presença da matriz verificou-se a ausência de turvação (não ocorreu a multiplicação celular). Ao contrário, à direita, na ausência da matriz observou-se turvação (ocorreu a multiplicação celular).

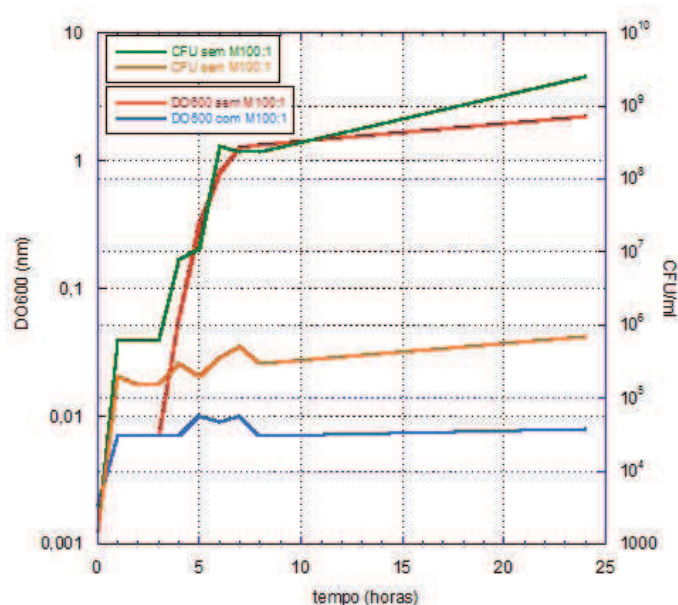


Figura 3.20: Representação gráfica dos valores da  $DO_{600}$  e da concentração celular em função do tempo de incubação de culturas de *S.aureus*, na ausência e na presença de M100:1 com NPs incorporadas, ao longo de 24 horas.

constantes (a concentração celular mantém-se abaixo das  $10^6$  CFU/ml), o que comprova a inibição do crescimento celular e o aspecto translúcido da cultura.

De salientar que nos testes de libertação das NPs a partir das matrizes (ver figura 3.12) verificou-se que o aumento da concentração das NPs no meio ocorre essencialmente durante a primeira hora. Verifica-se agora que é essencialmente durante este período que ocorre crescimento celular na cultura com a matriz. Pode assim concluir-se que o crescimento celular ocorre enquanto as NPs não estão disponíveis no meio em quantidade suficiente. Após ter

decorrido 1 hora a concentração bacteriana na cultura sem matriz continua a aumentar enquanto que na presença de matriz se mantém. Este fenómeno é compatível com o facto das NPs actuarem como agente biocida bacteriostático quando em contacto com as bactérias, inibindo a sua proliferação celular.

### 3.5.2 Testes de difusão pelo método de Kirby- Bauer

Nos testes de difusão pelo método de Kirby-Bauer, foram utilizados discos das matrizes de nanofibras M200:1, M100:1 e M50:1 com 10 mm de diâmetro. As matrizes de nanofibras de apenas PVP foram usadas como controlo da esterilidade do processo, como também de comparação entre a ausência e presença de NPs em fibras de PVP. Para a realização dos testes de Kirby-Bauer utilizaram-se 4 estirpes bacterianas (ver tabela 2.3) e o fungo *C. albicans*. Para todas as estirpes partiu-se de suspensões celulares com a concentração de  $10^8$  CFU/ml.

Através do método de Kirby-Bauer avaliou-se o efeito biocida das matrizes com NPs em função da proporção de PVP para  $\text{AgNO}_3$  usada na solução precursora. Consideram-se para tal amostras das matrizes M200:1, M100:1 e M50:1 todas irradiadas com UV durante 4 horas. Também se analisou pelo método de Kirby-Bauer o efeito biocida da matriz M100:1 contendo NPs geradas por exposição a radiação UV durante diferentes tempos, nomeadamente, 4h, 6h e 8 horas.

Os resultados obtidos podem ser influenciados pela massa das amostras já que diferentes massas de uma mesma amostra terão diferentes quantidades de NPs e, consequentemente, o perfil da sua difusão no Agar será também diferente. Assim, tentou-se que os discos usados para cada tipo de comparação tivessem massas semelhantes. Na tabela 3.8 apresentam-se as massas das amostras usadas em cada teste.

No momento em que amostras entraram em contacto com o meio húmido, neste caso o Agar, denotou-se a sua contracção, tal como se previa tendo em conta o observado na secção 3.2.

As NPs ao serem libertadas, difundem-se no Agar a partir do disco. A actividade biocida das NPs foi identificada e avaliada pelo diâmetro da zona de inibição do crescimento. De facto, surgiram halos de inibição à volta das amostras testadas, à excepção da de PVP, como as imagens da figura 3.21 mostram. O efeito biocida, sobre as várias estirpes de microrganismos das várias matrizes consideradas, foi avaliado pela medição dos diâmetros da zona de inibição. Estes diâmetros encontram-se registados na tabela 3.9.

As observações (ver figura 3.21) sugerem haver uma diminuição da concentração de NPs à medida que a distância de difusão das NP a partir dos discos aumenta. No caso do fungo, a cultura não se encontrava confluenta e a zona de inibição corresponde apenas ao diâmetro da própria amostra. O facto de a cultura não estar confluenta pode dever-se a uma baixa concentração de suspensão celular de *C.albicans* plaqueada ou a um plaqueamento não homogéneo e reduzido da cultura.

Tabela 3.8: Massas dos discos das matrizes de nanofibras com 10mm utilizados nos testes de difusão pelo método de Kirby-Bauer (ver figura 3.21 e tabela 3.9).

Massa dos discos de matrizes de nanofibras(mg) usados em cada teste						
	M200:1(4h)	M100:1(4h)	M50:1(4h)	M100:1(8h)	M100:1(6h)	M100:1(4h)
<i>S.aureus</i>	0,0032	0,0023	0,022	0,001	0,001	0,0016
<i>S.epidermis</i>	0,0021	0,0026	0,0027	0,0026	0,0026	0,0023
<i>P.aeruginosa</i>	0,0028	0,0022	0,0026	0,0011	0,001	0,0016
<i>E.coli</i>	0,0018	0,0023	0,0023	0,0023	0,0025	0,0022
<i>C.albicans</i>	0,0028	0,0021	0,0011	0,021	0,001	0,0016

Como se observa na figura 3.21 e na tabela 3.9, com o aumento da proporção de  $\text{AgNO}_3$  para PVP (matrizes M200:1, M100:1 e M50:1) denota-se um aumento da zona de inibição relativamente às bactérias *S.aureus* e *S.epidermis*. Para a *P.aeruginosa* não se verifica uma tendência determinada e para a *E.coli* o diâmetro é independente da proporção. O mesmo se verifica para o fungo *C.albicans* para o qual a zona de inibição corresponde aproximadamente ao diâmetro da própria amostra.

Os resultados obtidos nas secções anteriores mostraram que o aumento da proporção de  $\text{AgNO}_3$  para PVP, utilizada na produção das matrizes, leva a um aumento da quantidade, do tamanho médio e da dispersão de tamanhos das NPs produzidas nas matrizes de nanofibras (ver figura 3.13). As relativamente largas zonas de inibição correspondentes às amostras de M200:1 pode ser consequência das NPs desta amostra serem menores e por sua vez mais facilmente se difundir pelo Agar. De facto existe pouca diferença entre os halos em torno das amostras M200:1 e M100:1.

Tabela 3.9: Resultados dos testes de difusão pelo método de Kirby-Bauer realizados com diferentes estirpes de bactérias (*S.aureus*, *S.epidermidis*, *P.aeruginosa*, *E.coli*) e com o fungo *C.albicans*. Para comparar os efeitos biocidas foram medidos os diâmetros das zonas de inibição.

Zonas de inibição (mm)						
Amostra	Tempo de irradiação UV/h	<i>S.aureus</i>	<i>S.epidermidis</i>	<i>P.aeruginosa</i>	<i>E.coli</i>	<i>C.albicans</i>
PVP	4	0	0	0	0	0
M200:1	4	12	13	11	10	5
M100:1	4	13	15	13	10	5
M50:1	4	17	16	10	10	6
M100:1	8	13	15	13	10	5
	6	13	15	13	10	5
	4	13	15	13	10	5

Em relação às amostras de M100:1 sujeitas aos diferentes tempos de irradiação UV (4h,

6h e 8horas) foram encontradas zonas de inibição de tamanho idêntico para cada microrganismo, independentemente do tempo de irradiação UV. A proporção de  $\text{AgNO}_3$  para PVP, utilizada na produção destas amostras, foi sempre a mesma para todas as amostras, isto é, a disponibilidade inicial de iões  $\text{Ag}^+$  em todas as amostras antes de irradiadas seria semelhante.

Nas secções anteriores verificou-se que para os maiores tempos de irradiação as NPs tendiam a formar aglomerados. Apesar disto, os resultados obtidos pelo método de Kirby-Bauer, não revelam diferenças no tamanho das zonas de inibição. Há que salientar que este tipo de teste apenas permite fazer uma avaliação qualitativa do efeito biocida, não permitindo fazer avaliações quantitativas.

À semelhança do que foi verificado em estudos anteriores os resultados obtidos mostram que as NPs produzidas possuem um efeito tóxico sobre bactérias e fungos [Dong et al., 2010, Feng et al., 2000, Elichiguerra et al., 2005, Kim et al., 2007, Kim et al., 2009, Li et al., 2011, Wu et al., 2009]. Assim conclui-se que com a introdução de NPs nas matrizes de nanofibras, as matrizes adquirem propriedades biocidas. Desta forma, as matrizes ao mesmo tempo que ajudam à regeneração dos tecidos, também actuam como barreira à entrada de microrganismos.

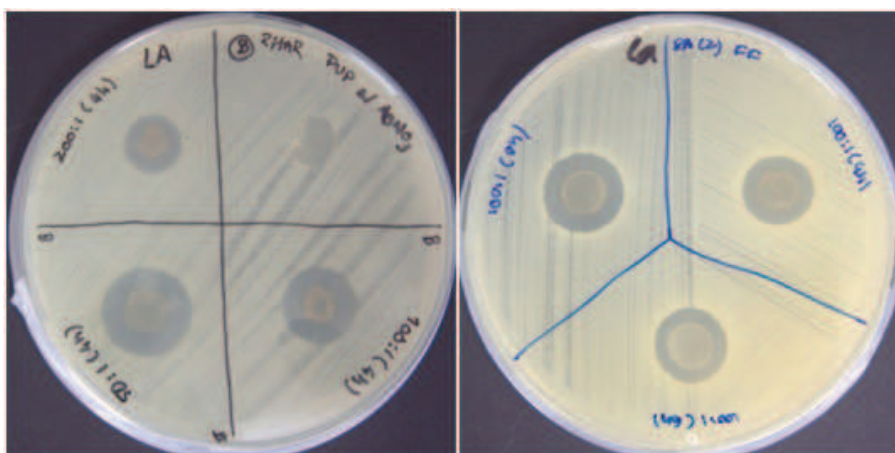
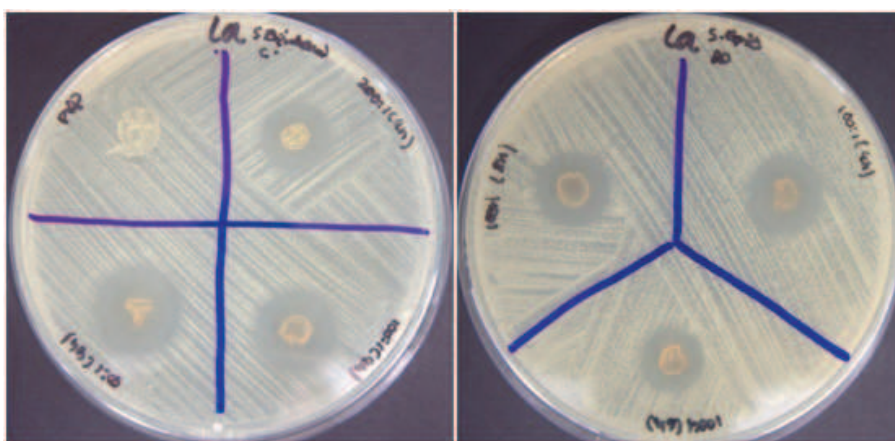
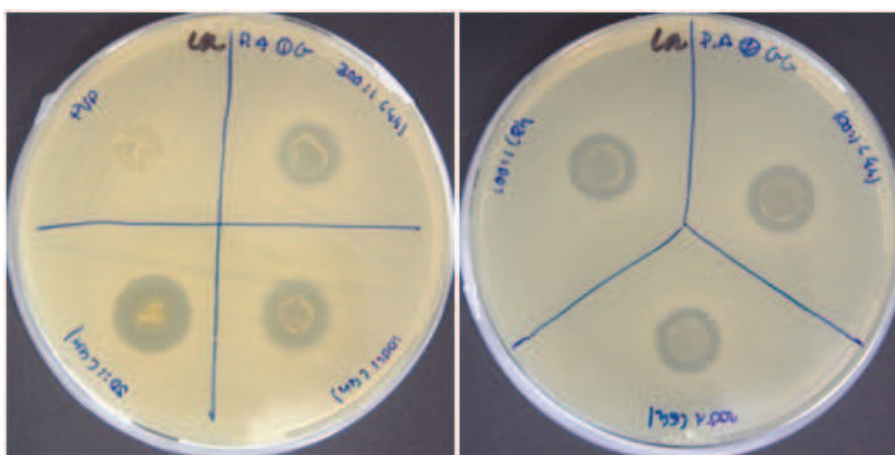
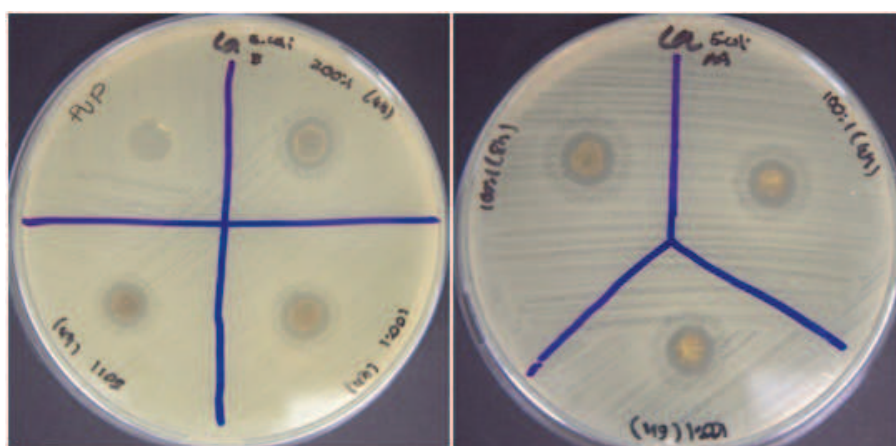
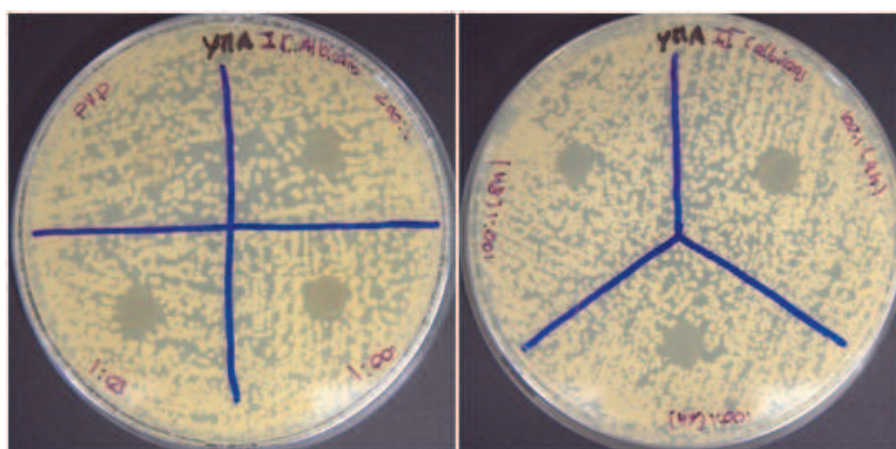
(a) *S.aureus*(b) *S.epidermidis*(c) *P.aeruginosa*

Figura 3.21: Resultados dos testes de susceptibilidade dos microrganismos *S.aureus*, *S.epidermidis*, *P.aeruginosa*, *E.coli* e *C.albicans* às matrizes de nanofibras com NP incorporadas obtidos pelo método de Kirby-Bauer. Foram testadas as matrizes M200:1, M100:1 e M50:1 sujeitas a 4 horas de irradiação UV e a matriz M100:1 sujeita a diferentes tempos de irradiação UV (4h, 6h e 8 horas).





(d) *E. coli*



(e) *C. albicans*

Figura 3.21: Resultados dos testes de susceptibilidade dos microrganismos *S. aureus*, *S. epidermidis*, *P. aureginosa*, *E. coli* e *C. albicans* às matrizes de nanofibras com NP incorporadas obtidos pelo método de Kirby-Bauer. Foram testadas as matrizes M200:1, M100:1 e M50:1 sujeitas a 4 horas de irradiação UV e a matriz M100:1 sujeita a diferentes tempos de irradiação UV (4h, 6h e 8 horas).

### 3.6 Testes de citotoxicidade

Após 48 horas de incubação das culturas celulares de HEK (do inglês, *Human Epithelial Kidney*) foram realizados os testes de citotoxicidade por contacto directo utilizando o reagente PrestoBlue™.

Como foi referido anteriormente, os testes de citotoxicidade foram realizados em triplicado. As amostras utilizadas possuíam as massas indicadas na tabela 3.10. Para cada proporção e tempo de irradiação tentou-se utilizar massas semelhantes para poder efectuar uma análise comparativa dos resultados obtidos.

Tabela 3.10: *Massa dos discos de matrizes de nanofibras utilizados para os testes de citotoxicidade.*

Massa dos discos de matrizes de nanofibras (mg) usada em cada teste						
Amostra	M200:1(4h)	M100:1(4h)	M50:1(4h)	M100:1(8h)	M100:1(6h)	M100:1(4h)
1	0,0038	0,0027	0,0031	0,0024	0,0025	0,0027
2	0,0038	0,0028	0,0033	0,0020	0,0025	0,0028
3	0,0037	0,0029	0,0036	0,0024	0,0025	0,0029

Os resultados obtidos estão representados na figura 3.22 e na tabela 3.11. Como se pode observar na figura existem poços nos quais o reagente tomou a cor azul e outros a cor púrpura. A coloração púrpura demonstra a ocorrência de actividade metabólica, havendo redução do composto resazurina para resafurina, indicando a presença de células viáveis. Ao contrário, a cor azul denota a ausência de células viáveis indicando que houve morte celular.

Através da leitura da fluorescência efectuada para a suspensão de cada poço após a realização do teste, calculou-se a viabilidade celular média relativa correspondente a cada amostra, considerando que a viabilidade celular de 100% corresponde à fluorescência obtida na leitura dos controlos negativos. Os resultados estão indicados na tabela 3.11.

Os resultados da tabela 3.11 mostram que as células que estavam em contacto com as matrizes de nanofibras com NPs incorporadas possuíam uma viabilidade celular média muito baixa sugerindo portanto a ocorrência de morte celular. Apenas às matrizes de nanofibras de PVP sem NPs corresponde uma viabilidade celular média elevada (maior do que a do controlo negativo de citotoxicidade). O mesmo se verificou para os testes de adesão celular, onde as células foram semeadas directamente sobre as matrizes, como se observa nos resultados da tabela 3.12.

Na figura 3.23 mostram-se algumas imagens das células semeadas sobre as matrizes. As células semeadas nas matrizes foram fixadas com glutaraldeído, lavadas com PBS e desidratadas numa série de soluções de etanol em água desionizada com concentração crescente (ver anexo A). As células foram observadas num microscópio de contraste de fase e, depois de recobertas com uma fina camada condutora, foram analisadas em SEM (ver figura 3.23).

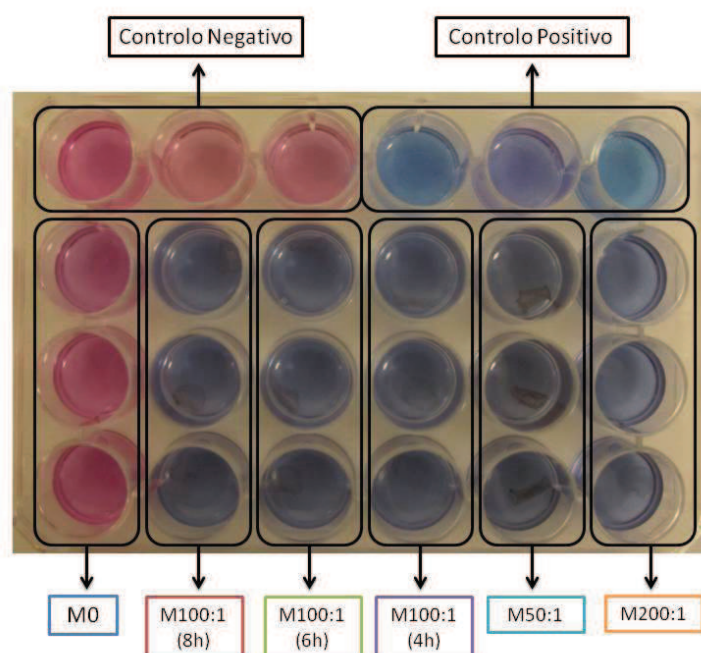


Figura 3.22: Resultados obtidos nos testes de citotoxicidade pelo método de contacto directo com as matrizes M0, M200:1, M100:1 e M200:1 utilizando como indicador o reagente PrestoBlue™. Observam-se poços com cor púrpura onde há células viáveis e poços com cor azul onde a viabilidade celular é nula ou residual.

Tabela 3.11: Resultados das medições de fluorescência efectuados ao meio celular após a realização do teste de citotoxicidade pelo método de contacto directo usando como indicador o reagente PrestoBlue™. A última linha da tabela indica a viabilidade celular relativa na presença de cada matriz, calculada a partir das leituras médias de fluorescência dos três ensaios.

	Controlo negativo	Controlo positivo	M0	M100:1 (8h)	M100:1 (6h)	M100:1 (4h)	M50:1 (4h)	M200:1 (4h)
Medições	5150	1689	5211	291	260	242	234	288
Fluorescência	3378	1017	6230	290	291	252	253	254
	3564	1159	6723	327	280	253	259	338
Média de Fluorescência	4030,7	1288,3	6055	302,7	277	249	248,7	293,3
Viabilidade celular média (%)	100	32	150	7,5	6,9	6,2	6,2	7,3



**Tabela 3.12:** Resultados das medições de fluorescência efectuados ao meio celular após a realização do teste de citotoxicidade pelo método de adesão celular usando como indicador o reagente PrestoBlue™. A última linha da tabela indica a viabilidade celular relativa na presença de cada matriz, calculada a partir das leituras médias de fluorescência dos três ensaios.

	Controlo negativo	Controlo positivo	M0	M100:1 (8h)	M100:1 (6h)	M100:1 (4h)	M50:1 (4h)	M200:1 (4h)
<b>Medições</b>	2984	1599	2970	225	283	262	244	296
<b>Fluo- rescência</b>	2916	1227	2398	226	287	286	237	226
	2857	1349	2012	238	259	245	262	307
<b>Média de Fluo- rescência</b>	2919	1391,7	2460,0	229,7	276,3	264,3	247,7	276,3
<b>Viabilidade celular média (%)</b>	100	47,7	84,3	7,9	9,5	9,1	8,5	9,5

Na figura 3.23 pode observar-se a influência da presença de NPs na morfologia das células: na imagem 3.23a o tapete celular está espraído nas fibras de PVP onde as células aderiram, já nas imagens 3.23b, 3.23c e 3.23d, na presença de NPs, as células apresentam uma forma arredondada característica de células inviáveis. Assim se conclui que a matriz de PVP promove a proliferação e crescimento celular, mas o contrário se verifica para a matriz de PVP com NPs incorporadas.

Desta forma, conclui-se que a libertação de NPs para o meio tem um efeito tóxico para as células levando à morte celular. Os resultados obtidos relativos ao comportamento das NPs sobre as células estão de acordo com o que foi verificado em estudos anteriores [Ahamed et al., 2010, AshaRani et al., 2009, Chun et al., 2010, Foldbjerg et al., 2011, Kruszewski et al., 2011, Samberg et al., 2010].

Em conclusão, a incorporação de NPs nas matrizes de nanofibras induz-lhes propriedades biocidas e citotóxicas. Deste modo, as matrizes ajudam à regeneração dos tecidos e impedem a entrada de microrganismos, mas ao mesmo tempo são tóxicas para as células, provocando a morte celular. De facto, uma vez que o objectivo destas matrizes é ajudar à regeneração e à proliferação celular dos tecidos lesados (feridas ou queimaduras extensas), o facto de possuírem características citotóxicas pode prejudicar na sua actuação, por causar a morte celular. Porém há que ter em conta o balanço da sua utilização, analisando os danos provocados pelas NPs em função da sua actuação benéfica.

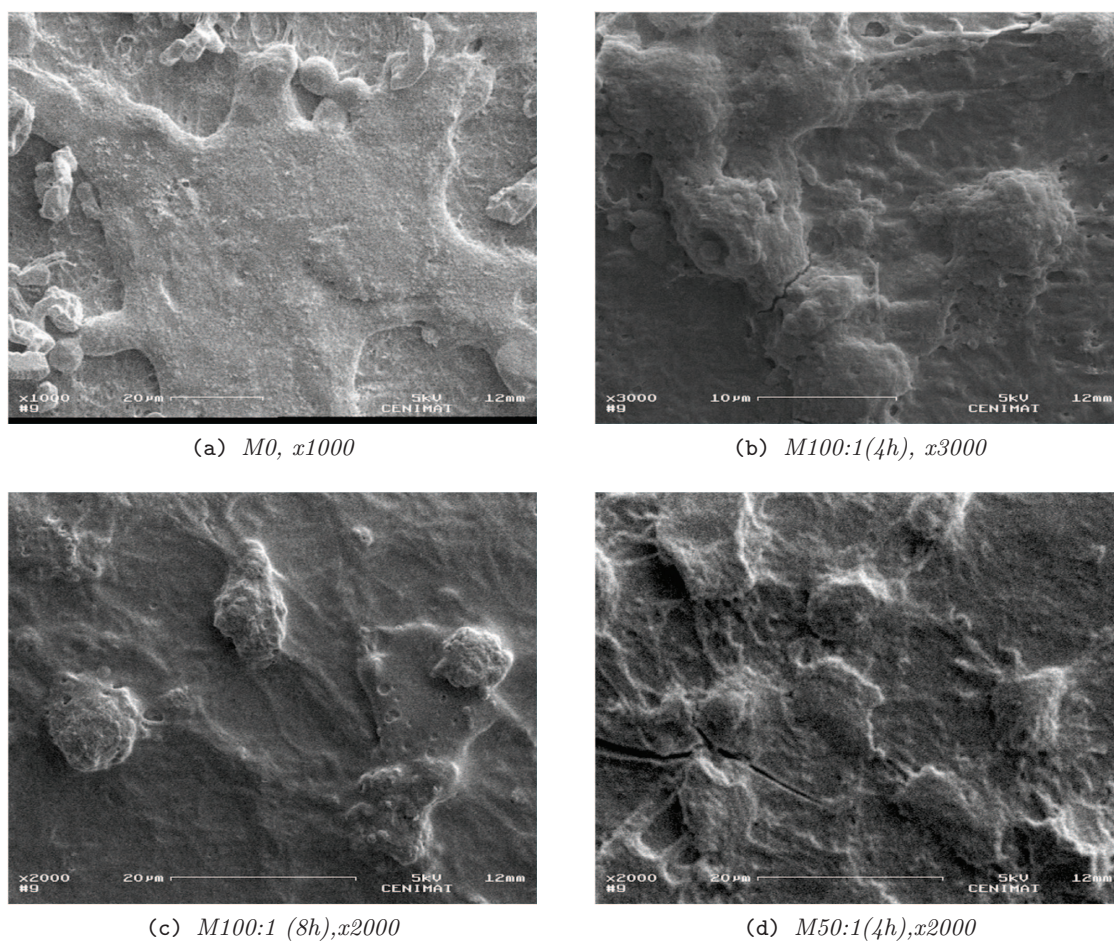


Figura 3.23: Imagens de SEM das células semeadas nas matrizes após terem sido fixadas: (a)  $M0$ , (b)  $M100:1(4h)$ , (c)  $M100:1(8h)$  e (d)  $M50:1(4h)$ .

## Capítulo 4

# Conclusões e Perspectivas Futuras

O tema da presente dissertação, Incorporação de nanopartículas de prata em matrizes de nanofibras de polivinilpirrolidona e avaliação do seu potencial antimicrobiano, insere-se na área dos Biomateriais e na Engenharia de Tecidos.

Neste trabalho foi possível produzir matrizes de nanofibras, através do processo de electrofiação, de uma forma simples e de baixo custo e incorporar nanopartículas de prata à sua constituição pela redução de iões de prata por exposição a radiação UV. Foram fiadas três soluções poliméricas com diferentes proporções de PVP:AgNO<sub>3</sub> (200:1, 100:1 e 50:1), cada uma com diferentes parâmetros de fiação. A fiação das soluções mais condutoras apresentou um maior grau de dificuldade.

As matrizes obtidas foram expostas a vários tempos de irradiação UV com o objectivo de reticular o PVP e de formar NPs.

Através de testes de grau de inchamento e de perda de massa verificou-se que, a partir das 2 horas de irradiação UV, estes valores diminuíram e estabilizaram, mostrando a ocorrência da reticulação do PVP. O mesmo se verificou por espectrofotometria de UV-vis, observando-se um aumento de absorvância a 290 nm.

Para verificar a presença de NPs nos filmes e matrizes de nanofibras produzidos recorreu-se à espectrofotometria de UV-Visível.

Os filmes de soluções poliméricas com diferentes proporções de PVP:AgNO<sub>3</sub> foram sujeitos a vários tempos de irradiação UV e de seguida obtidos os seus espectros de UV-vis. Nos espectros surgiu um pico de absorvância ( ~425 nm) característico da SPR nas NPs, que aumentou durante as primeiras 4 horas, estabilizando em seguida. Ao mesmo tempo, o pico deslocou-se para comprimentos de onda superiores. Estes resultados revelaram que houve formação de NPs nos filmes e que tanto o tamanho médio como a dispersão das NPs aumentaram nas amostras analisadas com o aumento de exposição a radiação UV.

Para aferir a formação das NPs nas matrizes de nanofibras obtidas pela fiação das três soluções poliméricas efectuaram-se espectros de UV-vis da água, na qual as matrizes estavam imersas, ao longo de 6 horas. A concentração das NPs libertadas para água, aquando da imersão das matrizes em água, aumentou nas primeiras 2 horas, estabilizando de seguida. A

diminuição da taxa de libertação das NPs pode dever-se à extinção das NPs incorporadas as matrizes. Desta forma, prevê-se que quando uma matriz contendo NPs entrar em contacto com o exsudado liberte rapidamente NPs.

O estudo da morfologia das NPs foi realizado por Microscopia Electrónica de Tansmissão (TEM). Foram analisadas matrizes de nanofibras com as três proporções de PVP:AgNO<sub>3</sub> (M200:1, M100:1 e M50:1) com 4 horas de irradiação UV e apenas a matriz M100:1 com 30, 60, 120, 240, 360 e 480 minutos de irradiação UV.

As imagens de TEM revelaram que as NPs encontravam-se dispersas pelas nanofibras e que tanto o tamanho como a distribuição das NPs sofreu algumas alterações com o aumento de AgNO<sub>3</sub> e com o tempo de exposição a radiação UV. Os resultados mostram que o tamanho das aumenta directamente com a proporção de PVP:AgNO<sub>3</sub> e com o aumento do tempo de irradiação e a sua distribuição torna-se menos uniforme.

Os testes microbiológicos e de citotoxicidade permitiram que se desenvolvesse algum conhecimento na área da microbiologia e da biologia.

Para testar a acção biocida das matrizes de nanofibras com NPs incorporadas sobre diferentes microrganismos (bactérias e fungos) realizaram-se testes de difusão por disco (teste de Kirby-Bauer)/Concentração Mínima Inibitória (MIC). Os resultados de ambos os testes foram de encontro com as expectativas no sentido em que as amostras registaram actividade antibacteriana contra as estirpes testadas neste trabalho.

Nos testes de citotoxicidade conclui-se que as matrizes de nanofibras com NPs incorporadas são tóxicas para as células HEK.

Em conclusão, verificou-se que a incorporação de NPs nas matrizes de nanofibras atribui-lhes propriedades biocidas e citotóxicas. Desta forma, as matrizes ajudam à regeneração dos tecidos e contribuem para impedir a entrada de microrganismos, mas ao mesmo tempo verificou-se serem tóxicas para as células, provocando a morte celular. De facto, uma vez que o objectivo destas matrizes é contribuir para a regeneração e proliferação celular dos tecidos lesados (feridas ou queimaduras extensas), o facto de apresentarem características citotóxicas pode prejudicar a sua actuação. Porém, há que ter em conta o balanço da sua utilização em cada caso particular, analisando os danos provocados pelas NPs e os seus efeitos benéficos.

De forma a melhorar este trabalho, o estudo da reticulação poderia ser complementado com estudos de Infravermelho por Transformada de Fourier (do inglês, *Fourier transform infrared spectroscopy*), com o intuito de avaliar as ligações formadas pela reticulação. Para avaliar a presença de NPs nas matrizes poderia ser realizado Difração de Raios-X (XRD, do inglês, *X-ray Diffraction*) como um método complementar. Também seria interessante estudar a formação das NPs nas nanofibras através de um corte transversal e a posterior visualização por TEM, de modo a perceber se a formação destas ocorre à superfície ou também no interior da nanofibra.

---

No âmbito do efeito antimicrobiano das NPs seria importante produzir matrizes de nanofibras de soluções poliméricas com proporções de PVP:AgNO<sub>3</sub> inferiores a 200:1 e também utilizar um polímero estabilizador de NPs que possuísse características antibacterianas e desta forma reduzir a concentração de NPs, podendo diminuir o efeito tóxico para células humanas. Como proposta final, uma vez que se testou o efeito citotóxico das NPs em células epiteliais de rim, seria pertinente estudar a actividade das NPs sobre células da derme e epiderme, uma vez que é a pele o local de actuação destas matrizes de nanofibras.



# Bibliografia

- [Ahamed et al., 2010] Ahamed, M., Alsalhi, M. S., and Siddiqui, M. K. J. (2010). Silver nanoparticle applications and human health. *Clinica chimica acta international journal of clinical chemistry*, 411(23-24):1841–1848.
- [Amro et al., 2000] Amro, N. A., Kotra, L. P., Wadu-Mesthrige, K., Bulychev, A., Mobashery, S., and Liu, G. Y. (2000). High-resolution atomic force microscopy studies of the escherichia coli outer membrane: structural basis for permeability. *Langmuir*, 16(6):2789–2796.
- [AshaRani et al., 2009] AshaRani, P. V., Low Kah Mun, G., Hande, M. P., and Valiyaveetil, S. (2009). Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in human cells. *ACS nano*, 3(2):279–290.
- [Black, 2008] Black, J. G. (2008). *Microbiology : principles and explorations*. John Wiley and Sons, Inc.
- [Cao, 2004] Cao, G. (2004). *Nanostructures and nanomaterials: synthesis, properties and applications*. Imperial College Press.
- [Castellano et al., 2007] Castellano, J. J., Shafii, S. M., Ko, F., Donate, G., Wright, T. E., Mannari, R. J., Payne, W. G., Smith, D. J., and Robson, M. C. (2007). Comparative evaluation of silver-containing antimicrobial dressings and drugs. *International Wound Journal*, 4(2):114–122.
- [Cengiz et al., 2009] Cengiz, F., Krucińska, I., Gliścińska, E., Chrzanowski, M., and Göktepe, F. (2009). Comparative analysis of various electrospinning methods of nanofibre formation. *Fibres and Textiles*, 17:13–19.
- [Chu and Liu, 2008] Chu, P. K. and Liu, X. (2008). Biomaterials fabrication and processing. *Change*, C.
- [Chun et al., 2010] Chun, J. Y., Kang, H. K., Jeong, L., Kang, Y. O., Oh, J.-E., Yeo, I.-S., Jung, S. Y., Park, W. H., and Min, B.-M. (2010). Epidermal cellular response to poly(vinyl alcohol) nanofibers containing silver nanoparticles. *Colloids and surfaces B Biointerfaces*, 78(2):334–342.



- [Dabirian et al., 2011] Dabirian, F., Hosseini Ravandi, S., Pishavar, A., and Abuzade, R. (2011). A comparative study of jet formation and nanofiber alignment in electrospinning and electrocentrifugal spinning systems. *Journal of Electrostatics*, 69(6):540–546.
- [Darroudi et al., 2011] Darroudi, M., Ahmad, M. B., Zak, A. K., Zamiri, R., and Hakimi, M. (2011). Fabrication and characterization of gelatin stabilized silver nanoparticles under uv-light. *Int. J. Mol. Sci*, 12:6346–6356.
- [Dedavid et al., 2007] Dedavid, B. A., Gomes, C. I., and Machado, G. (2007). *Microscopia Electrónica de Varredura - Aplicações e preparação de amostras : Materiais Poliméricos, metálicos e semicondutores*. EDIPUCRS.
- [Dong et al., 2010] Dong, G., Xiao, X., Liu, X., Qian, B., Ma, Z., Ye, S., Chen, D., and Qiu, J. (2010). Preparation and characterization of ag nanoparticle-embedded polymer electrospun nanofibers. *Journal of Nanoparticle Research*, 12:1319–1329.
- [Elichiguerra et al., 2005] Elichiguerra, J., Camacho, A., Holt, K., Kouri, J., Ramirez, J., and Yacaman, M. (2005). The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology*, 16:2346–2353.
- [Feng et al., 2000] Feng, Q. L., Wu, J., Chen, G. Q., Cui, F. Z., Kim, T. N., and Kim, J. O. (2000). A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on escherichia coli and staphylococcus aureus. *Journal of Biomedical Materials Research*, 52:662–8.
- [Fernandes, 2011] Fernandes, A. S. P. (2011). Desenvolvimento de uma cobertura para feridas baseada em nanofibras de iodopovidona. Master’s thesis, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa.
- [Fisher et al., 2011] Fisher, J. P., Mikos, A. G., and Bronzino, J. D. (2011). *Tissue Engineering*. CRC Press.
- [Foldbjerg et al., 2011] Foldbjerg, R., Dang, D. A., and Autrup, H. (2011). Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in the human lung cancer cell line, a549. *Archives of Toxicology*, 85(7):743–750.
- [Gouma, 2010] Gouma, P.-I. P. (2010). *Nanomaterials for Chemical Sensors and Biotechnology*. Pan Stanford Publishing Pte. Ltd.
- [Greiner and Wendorff, 2007] Greiner, A. and Wendorff, J. H. (2007). Electrospinning: a fascinating method for the preparation of ultrathin fibers. *Angewandte Chemie International Edition*, 46(30):5670–703.
- [Gualandi, 2011] Gualandi, C. (2011). *Porous Polymeric Bioresorbable Scaffolds for Tissue Engineering*. Springer.

- [Haaf et al., 1984] Haaf, F., Sanner, A., and Straub, F. (1984). Polymers of n-vinylpyrrolidone: Synthesis, characterization and uses. *Polymer journal*, 17:143–152.
- [Heunis and Dicks, 2010] Heunis, T. D. J. and Dicks, L. M. T. (2010). Nanofibers offer alternative ways to the treatment of skin infections. *Journal of biomedicine biotechnology*, 2010:4–9.
- [Kayser, 2005] Kayser, Fritz H., e. a. (2005). *Medical Microbiology*. Thieme.
- [Kim et al., 2007] Kim, J. S., Kuk, E., Yu, K. N., Kim, J.-H., Park, S. J., Lee, H. J., Kim, S. H., Park, Y. K., Park, Y. H., Hwang, C.-Y., and et al. (2007). Antimicrobial effects of silver nanoparticles. *Nanomedicine nanotechnology biology and medicine*, 3:95–101.
- [Kim et al., 2009] Kim, K.-J., Sung, W. S., Suh, B. K., Moon, S.-K., Choi, J.-S., Kim, J. G., and Lee, D. G. (2009). Antifungal activity and mode of action of silver nano-particles on candida albicans. *Biometals an international journal on the role of metal ions in biology biochemistry and medicine*, 22(2):235–242.
- [Kruszewski et al., 2011] Kruszewski, Marcin. Brzoska, K., Brunborg, G., Asare, N., Dobrzynska, M., and Dusinská, M. e. a. (2011). Toxicity of silver nanomaterials in higher eukaryotes. *Archives of Toxicology*, 5:180–211.
- [Li et al., 2011] Li, W.-R., Xie, X.-B., Shi, Q.-S., Duan, S.-S., Ouyang, Y.-S., and Chen, Y.-B. (2011). Antibacterial effect of silver nanoparticles on staphylococcus aureus. *Biometals an international journal on the role of metal ions in biology biochemistry and medicine*, 24(1):135–141.
- [Li et al., 2006] Li, Y., Leung, P., Yao, L., Song, Q. W., and Newton, E. (2006). Antimicrobial effect of surgical masks coated with nanoparticles. *J Hosp Infect*, 62:58–63.
- [Lobo, 2009] Lobo, R. F. M. (2009). *Nanotecnologia e Nanofísica*. Escolar Editora.
- [Lopérgolo et al., 2003] Lopérgolo, L. C., Lugão, A. B., and Catalani, L. H. (2003). Direct uv photocrosslinking of poly(n-vinyl-2-pyrrolidone) (pvp) to produce hydrogels. *Polymer*, 44:6217–6222.
- [Martínez-Castañón et al., 2008] Martínez-Castañón, G. A., Niño-Martínez, N., Martínez-Gutierrez, F., Martínez-Mendoza, J. R., and Ruiz, F. (2008). Synthesis and antibacterial activity of silver nanoparticles with different sizes. *Journal of Nanoparticle Research*, 10:1343–1348.
- [Pommerville, 2010] Pommerville, J. (2010). *Alcamo’s Fundamentals of Microbiology*. Jones & Bartlett Learning.

- [Prescott and Klein., 2002] Prescott, Lansing M., H. and Klein. (2002). *Microbiology*. McGraw-Hill.
- [Rai et al., 2009] Rai, M., Yadav, A., and Gade, A. (2009). Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. *Biotechnology Advances*, 27:76–83.
- [Ramakrishna, 2005] Ramakrishna, S. (2005). *An introduction to electrospinning and nanofibers*, volume 96.
- [Ratner, 1996] Ratner, B. (1996). *Biomaterials science: an introduction to materials in medicine*. Referex Engineering. Academic Press.
- [Saltzman, 2004] Saltzman, W. M. (2004). *Tissue engineering: engineering principles for the design of replacement organs and tissues*. Oxford University Press.
- [Samberg et al., 2010] Samberg, M. E., Oldenburg, S. J., and Monteiro-Riviere, N. A. (2010). Evaluation of silver nanoparticle toxicity in skin in vivo and keratinocytes in vitro. *Environmental Health Perspectives*, 118(3):407–413.
- [Sionkowska et al., 2008] Sionkowska, A., Kozłowska, J., Planecka, A., and Skopinska-Wisniewska, J. (2008). Photochemical stability of poly(vinyl pyrrolidone) in the presence of collagen. *Polymer degradation and stability*, 93:2127–2132.
- [Sionkowska et al., 2009] Sionkowska, A., Planecka, A., Kozłowska, J., and Skopińska-Wisniewska, J. (2009). Photochemical stability of poly(vinyl alcohol) in the presence of collagen. *Polymer Degradation and Stability*, 94:383–388.
- [Son et al., 2006] Son, W., Youk, J., and Park, W. (2006). Antimicrobial cellulose acetate nanofibers containing silver nanoparticles. *Carbohydrate Polymers*, 65:430–434.
- [Sondi and Salopek-Sondi, 2004] Sondi, I. and Salopek-Sondi, B. (2004). Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on e. coli as a model for gram-negative bacteria. *Journal of Colloid and Interface Science*, 275(1):177–182.
- [Stanger Jon and Mark, 2005] Stanger Jon, T. N. and Mark, S. (2005). Electrospinning. *Rapra Review Reports*, 16.
- [Wang et al., 2005] Wang, H., Qiao, X., Chen, J., Wang, X., and Ding, S. (2005). Mechanisms of pvp in the preparation of silver nanoparticles. *Materials Chemistry and Physics*, 94:449–453.
- [W.N, 2009] W.N, C. (2009). *Nanofibers: Fabrication, Performance and Applications*. Nova Science Publishers, Inc.

- [Wu et al., 2009] Wu, Y., Jia, W., An, Q., Liu, Y., Chen, J., and Li, G. (2009). Multi-action antibacterial nanofibrous membranes fabricated by electrospinning: an excellent system for antibacterial applications. *Nanotechnology*, 20:245101.
- [Xu and Zhou, 2008] Xu, X. and Zhou, M. (2008). Antimicrobial gelatin nanofibers containing silver nanoparticles. *Fibers and Polymers*, 9:685–690.
- [Zilberman, 2011] Zilberman, M. (2011). *Active Implants and Scaffolds for Tissue Regeneration*. Studies in Mechanobiology, Tissue Engineering and Biomaterials. Springer.



# Apêndice A

## Anexo

### A.1 Procedimento dos testes de citotoxicidade por contacto directo e de Adesão Celular

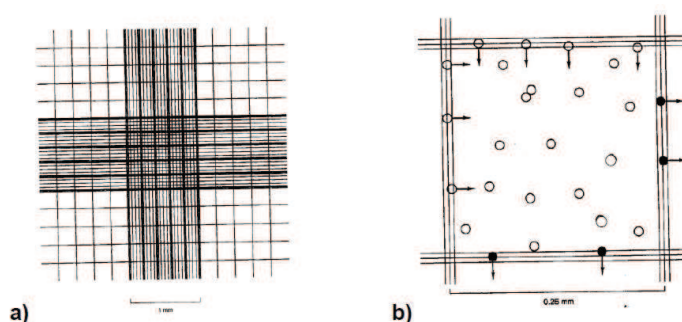
#### A.1.1 Manutenção das culturas

1. As células criopreservadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  foram colocadas em banho maria a  $37^{\circ}\text{C}$  e suavemente agitadas até descongelarem;
2. A suspensão celular foi transferida para um tubo de 15 ml estéril com meio previamente aquecido a  $37^{\circ}\text{C}$  e centrifugou-se a 2000 rpm para as células precipitarem;
3. Retirou-se o meio de descongelamento e resuspenderam-se as células em 4 ml de novo meio de cultura.
4. Pipetou-se 4 ml de suspensão celular para um frasco T25 e colocou-se na incubadora a  $37^{\circ}\text{C}$  e 5% de  $\text{CO}_2$  até as células ficarem confluentes.
5. Observou-se ao microscópio óptico invertido a monocamada celular e avaliou-se a sua confluência;
6. Lavou-se as células com PBS, para isso retirou-se completamente o meio do frasco e adicionou-se a este 3 ml de PBS;
7. Passou-se cuidadosamente a solução de PBS por toda a superfície do frasco à qual as células estavam aderidas;
8. Retirou-se o PBS e repetiu-se a lavagem com mais 3 ml de PBS novo;
9. Depois de remover todo o PBS do frasco, adicionou-se ao frasco 3 ml de tripsina para hidrolisar as proteínas das células responsáveis pela sua aderência à parede do frasco;
10. Passou-se cuidadosamente a tripsina por toda a superfície do frasco à qual as células estão aderidas e colocaram-se a incubar (incubadora da marca Binder, modelo CB150), durante 5 minutos, a  $37^{\circ}\text{C}$ , na incubadora de  $\text{CO}_2$ ;

11. Após retirar as células da incubadora de CO<sup>2</sup> adicionaram-se 3 ml de meio completo (DMEM suplementado com soro fetal bovino (20%), antibióticos e antimicóticos (penicilina e streptomomicina, 1%) para inativar a tripsina;
12. Posteriormente transferiu-se a solução para tubos de centrifuga de 50 ml, que foram a centrifugar durante 5 minutos a 2000 rpm;
13. Soltaram-se as células dando uma pancada forte na parte lateral do frasco;
14. Ressuspenderam-se as células em 3 ml de meio completo para a contagem de células.

### A.1.2 Contagem Celular

1. Retirou-se 10 µl de suspensão celular homogeneizada e adicionaram-se 10 µl de azul tripano (corante de exclusão: entra nas células não viáveis-permeabilizáveis);
2. Pipetou-se uma amostra de 10 µl para a câmara de contagem, o hematocitómetro (previamente limpo com etanol a 70%), após a devida montagem da lamela (lamela por cima do hematocitómetro);
3. Seguidamente procedeu-se à contagem do número de células viáveis e não viáveis presentes no campo de contagem (quadrado central, de acordo com a figura), recorrendo a um microscópio óptico invertido;



**Figura A.1:** Hemocitómetro. a) Ampliação da grelha de contagem, na qual o quadrado central de 1 mm de lado e 0.1 mm de profundidade, está subdividido em 25 quadrados cada um com 1/25 mm<sup>2</sup>. b) Ampliação de 1 dos 25 quadrados anteriores. Na contagem das células devemos seguir sempre a mesma regra, que pode ser por exemplo a que está representada neste esquema, sendo que as células não preenchidas (círculos sem preenchimento) devem ser incluídas, as células preenchidas (círculos preenchidos) devem ser excluídas (sendo por isso contadas no quadrado seguinte).

4. Após a contagem calculou-se a concentração de células viáveis presentes na suspensão celular, através da equação:

$$C = N \times 10^4 \times Dil$$

em que C representa o número de células existentes em 1 ml de suspensão celular (unidades em número de células/ml), N a média do número de células viáveis observado



### *A.1. PROCEDIMENTO DOS TESTES DE CITOTOXICIDADE POR CONTACTO DIRECTO E DE ADESÃO CELULAR*

---

por campo da câmara de contagem (isto é em  $(1 \times 1 \times 0,1) \text{ mm}^3 = 10^{-4} \text{ cm}^3$ ),  $10^4$  é o número de vezes que o volume de contagem cabe em 1ml, Dil o factor de diluição (neste trabalho o Dil foi de 2);

5. Dilui-se a suspensão celular com meio completo para obter  $10^5$  células/ml;
6. Posteriormente, para efectuar a sementeira, pipetou-se 50  $\mu\text{l}$  da suspensão celular para cada poço sem matrizes de nanofibras no caso do teste por contacto directo, já para o teste de adesão celular a suspensão foi pipetada directamente sobre as matrizes de nanofibras previamente colocadas dentro do poço, e em ambos os casos as placas de poços foram a incubar a  $37^\circ\text{C}$  durante alguns minutos;
7. De seguida adicionou-se 450  $\mu\text{l}$  de meio de cultura a cada poço, perfazendo 500 $\mu\text{l}$  de volume total, no caso dos testes de adesão celular é necessário que o meio de cultura seja adicionado cuidadosamente para que as matrizes não se soltem da lamela para ser possível a sua posterior visualização por SEM;
8. Com o auxílio de uma pinça esterilizada colocaram-se as matrizes de nanofibras em cada poço em contacto directo com o meio (este procedimento apenas pertence aos testes por contacto directo);
9. Nos controlos não foram colocadas as matrizes. Para realizar o controlo positivo adicionou-se 450  $\mu\text{l}$  de etanol a 70% em vez do meio de cultura, para que a viabilidade celular seja nula;
10. Colocaram-se as placas de 24 poços numa estufa a  $37^\circ\text{C}$  e 5%  $\text{CO}_2$  durante 48 horas para incubar as células.

#### **A.1.3 Avaliação da viabilidade celular com recurso ao teste Presto-Blue™**

11. A cada poço com as células incubadas adicionou-se 50  $\mu\text{l}$  do reagente PrestoBlue™;
12. Incubaram-se as amostras a  $37^\circ\text{C}$  durante 1 hora;
13. De seguida procedeu-se à leitura das medições de fluorescência no leitor de placas com os filtros 530 nm (excitação) e 590 nm (emissão);
14. Por fim calculou-se a % viabilidade celular relativa;

#### **A.1.4 Fixação das matrizes para o teste de Adesão Celular nas matrizes de nanofibras**

15. Retirou-se o meio dos poços com as matrizes de nanofibras coladas em lamelas e lavou-se a monocamada com PBS;

16. De seguida fixaram-se as células com 500  $\mu$ l Glutaraldeído a 3% em PBS durante 48 horas;
17. Lavaram-se os poços com PBS;
18. Desidrataram-se as células com soluções de Etanol a 70%, 80%, 90% e 100%, por períodos de 10 minutos excepto a última solução que apenas foi retirada no momento da secagem por ponto crítico;
19. Efectuou-se a secagem por ponto crítico e analisaram-se as amostras por SEM.